



Universidade de Aveiro Departamento de Química
Ano 2017

**Mariana Pereira
Reis**

**Estudo do perfil lipídico da alga *Grateloupia
turuturu* cultivada em IMTA**

**Study of lipidic profile of macroalgae
Grateloupia turuturu cultivated in IMTA**



Universidade de Aveiro Departamento de Química
Ano 2017

Mariana Pereira Reis **Estudo do perfil lipídico da alga *Grateloupia turuturu* cultivada em IMTA**

Study of lipidic profile of macroalgae *Grateloupia turuturu* cultivated in IMTA

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Bioquímica (especialização em Bioquímica Alimentar), realizada sob a orientação científica da Doutora Maria do Rosário Gonçalves Reis Marques Domingues, Professora Associada com Agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro e da Doutora Maria Helena Trindade de Abreu, co-fundadora da empresa ALGAplus, Lda.

Apoio financeiro da FCT, da União Europeia, QREN, no âmbito do Programa Operacional Temático Fatores de Competitividade (COMPETE).

Apoio financeiro à unidade de investigação QOPNA (projeto PEst-C/QUI/UI0062/2013; FCOMP-01-0124-FEDER-037296).



Dedico este trabalho à minha família e namorado pelo incansável apoio.

o júri
Presidente

Doutora Rita Maria Pinho Ferreira

Professora auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Doutora Susana Maria de Almeida Cardoso

Bolseira de pós-doutoramento do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

Doutora Maria Helena Trindade de Abreu

Diretora de I&D e Cofundadora da empresa ALGAplus

agradecimentos

Gostaria de agradecer, em primeiro lugar às minhas orientadoras Professora Rosário Domingues e Doutora Helena Abreu pelos seus ensinamentos, orientação e dedicação ao longo deste ano.

A todo o grupo de espetrometria de massa, às pessoas que trabalharam comigo no laboratório pela ajuda e disponibilidade e boa disposição. Agradeço em especial à Elisabete Costa por toda a paciência, dedicação e carinho e à Eva pelo companheirismo ao longo deste ano.

A toda a equipa da ALGApplus pelos ensinamentos e integração na empresa. Em especial agradeço ao Doutor Rui Pereira, Andreia Rego e Sara Morgado pela orientação e paciência durante o período em que estive na empresa.

Aos meus pais, irmão e namorado que sempre apoiaram nos momentos mais difíceis. Sem eles nada disto seria possível.

A todos um enorme e sincero obrigada.

palavras-chave

Grateloupia turuturu; aquacultura multitrófica integrada; lipidómica; ácidos gordos; PUFA; lípidos polares; atividade antioxidante

resumo

As algas são consideradas uma das mais promissoras e sustentáveis fontes de biomassa sendo utilizadas na indústria alimentar, farmacêutica, cosmética e de biocombustíveis. O interesse crescente na comercialização de algas, levou ao desenvolvimento de várias técnicas de algicultura. Atualmente a técnica de aquacultura multitrófica integrada (IMTA) tem ganho destaque uma vez que propõe a integração de vários níveis tróficos no mesmo sistema de aquacultura permitindo a mitigação da libertação do desperdício da aquacultura, aumentando a produtividade dos organismos extrativos, como é o caso das algas. Neste sentido, a empresa ALGAPlus elegeu esta técnica sustentável para a produção de diversas algas presentes na costa portuguesa.

A *Grateloupia turuturu* é uma alga vermelha comestível com alto valor nutritivo. É uma espécie não nativa da costa Portuguesa, de caráter não invasivo, com potencial para comercialização na área alimentar e farmacêutica. Assim este trabalho de mestrado teve como objetivos: a avaliação do potencial de cultivo de *G. turuturu* num sistema experimental IMTA, tendo em conta a influência do estado reprodutivo da alga; a comparação da composição bioquímica de *G. turuturu* de cultivo com a alga recolhida nas populações selvagens da Ria de Aveiro, aprofundando a composição lipídica da alga através da análise de ácidos gordos (AG) e lípidos polares através de uma abordagem lipidómica e a determinação da atividade antioxidante do extrato lipídico da *G. turuturu* selvagem e de cultivo. A alga foi cultivada num sistema experimental em IMTA na empresa ALGAPlus onde foi feito um estudo preliminar para avaliar a taxa de crescimento e a produtividade de duas fases do seu ciclo de vida (reprodutiva e não reprodutiva). A composição bioquímica da biomassa resultante foi estudada quanto ao teor de lípidos, proteína, cinzas e fibra. A fração lipídica foi extraída com clorofórmio/metanol e analisada em termos de AG metil esterificados por GC-MS e em termos de lípidos polares por HPLC-MS. A atividade antioxidante do extrato lipídico foi avaliada pelo método do DPPH.

De um modo geral, verificou-se que a alga cresceu no sistema de cultivo em ambas as fases do ciclo de vida, contudo a alga reprodutiva apresentou uma maior produtividade. Em termos de composição bioquímica a *G. turuturu* apresentou uma grande percentagem de proteínas e fibra e baixo teor em lípidos e cinzas. Observou-se que de um modo geral a *G. turuturu* apesar de apresentar um baixo teor de lípidos contém uma elevada quantidade de PUFA apresentando um rácio $n-6/n-3$ abaixo de 1. Foi caracterizado pela primeira vez o perfil de lípidos polares da *G. turuturu* em que foram identificadas 64 espécies correspondendo a glicolípidos (sulfoquinovosildiacilgliceróis, sulfoquinovosilmonoacilgliceróis, di- e monogalactosildiacilgliceróis), glicerofosfolípidos (liso- e fosfatidicolinas, ácidos fosfatídicos, liso- e fosfatidilgliceróis e fosfatidiletanolamina) e di- e monoacil betaínas. Adicionalmente, o extrato lipídico demonstrou atividade antioxidante.

Desta forma, este estudo permitiu evidenciar a composição de *G. turuturu* cultivada em IMTA de modo a valorizar esta alga como um produto alimentar e como fonte de compostos bioativos. No entanto são necessários estudos posteriores para validar estes resultados.

keywords

Grateloupia turuturu; integrated multitrophic aquaculture; lipidomics; fatty acids; polar lipids; antioxidant activity

abstract

Algae are one of the most promising and sustainable sources of biomass for a wide variety of products. Currently, algae can be consumed directly by humans or used in animal nutrition, food additives, fertilizers, biofuel, cosmetics, and medicine. The growing interest in the commercialization of algae has led to the development of various techniques of algiculture. Currently, the integrated multitrophic aquaculture technique (IMTA) has gained popularity since it proposes the integration of several trophic levels in the same aquaculture system, thus, allow the mitigation of the aquaculture waste. Therefore, the company AlgaPlus chose this sustainable technique for the production of several algae present on the portuguese coast.

Grateloupia turuturu is an edible red seaweed with high nutritional value originating in Japan and has dispersed along the Atlantic coast including Portugal. It is a non-native species with potential for commercialization in the food and pharmaceutical industries. Thus, this work has different aims: an evaluation of the cultivation potential of *G. turuturu* in an experimental IMTA system, taking into account the influence of the life cycle phase of the seaweed; comparison of the biochemical composition of cultivated *G. turuturu* and the wild populations of the Ria de Aveiro; analysis of fatty acids (AG) and polar lipids through a lipidomic approach and determination of antioxidant activity of lipid extract of the *G. turuturu* wild and cultivated. The algae were grown in an experimental system at IMTA at the company ALGAplus where the growth rate and productivity of two stages of its cycle (reproductive and non-reproductive) were evaluated. The biochemical composition was studied for the lipid, protein, ash and fiber content. The lipid fraction was extracted with chloroform/methanol. The fatty acid methyl ester was analyzed by GC-MS and the polar lipids by HPLC-MS. The antioxidant activity of the lipid extract was evaluated by the DPPH method.

Generally, it was found that algae grew in aquaculture system in both life-cycle phases, however, the reproductive alga exhibits higher productivity. The biochemical composition of *G. turuturu* presented a high percentage of proteins and fiber and low lipids and ashes. It was observed that the *G. turuturu* exhibit low lipid content, however, contains a high amount of PUFA resulting in an $n-6/n-3$ ratio below 1. It was characterized for the first time the polar lipid profile of *G. turuturu*, 65 species of glycolipids (sulfoquinovosyldiacylglycerols, sulfoquinovosylmonoacylglycerols, di- and monogalactosyldiacylglycerols), glycerophospholipids (lyso- and phosphatidylcholine, phosphatidic acids, lyso- and phosphatidylglycerols and phosphatidylethanolamine) and di- and monoacyl betaines lipids were identified. Additionally, the lipid extract showed antioxidant activity.

In this way, this study contributes to the valorisation of *G. turuturu* cultivated in IMTA as a food product and as a source of bioactive compounds. However, further studies are necessary to validate these results.

Índice

Lista de Tabelas.....	ii
Lista de Figuras.....	iii
Lista de abreviaturas	v
Capítulo I: Introdução	7
I. Introdução	1
1. Composição da G. turuturu	5
1.1. Proteínas presentes na G. turuturu	7
1.2. Hidratos de carbono presentes na G. turuturu	8
1.3. Lípidos presentes na G. turuturu	9
2. Propriedades biológicas da G. turuturu	17
2.1. Propriedade Anti-fouling	17
2.2. Propriedade antibacteriana	18
2.3. Propriedade anticoagulante	19
2.4. Atividade antiviral da G. turuturu	20
2.5. Atividade antioxidante da G. turuturu	21
Capítulo II: Cultivo em IMTA na empresa ALGAplus	31
I. Materiais e Métodos	25
1.1. Sistema de cultivo	25
1.1. Parâmetros ambientais	26
1.2. Desenho experimental do cultivo de G. turuturu em IMTA	26
1.3. Cálculo dos parâmetros de crescimento	27
II. Resultados e Discussão	28
2.1. Parâmetros ambientais	28
2.2. Ensaio de crescimento da G. turuturu na fase reprodutiva do ciclo de vida.....	30
2.3. Ensaio de crescimento da G. turuturu na fase não reprodutiva do ciclo de vida	31
Capítulo III: Estudo da composição bioquímica da G. turuturu e suas variações em IMTA	43
I. Materiais e Métodos	37
1.1. Amostragem.....	37
1.2. Teor de Cinzas	37
1.3. Proteína total	38
1.4. Extração de lípidos.....	38
1.5. Fibra dietética total	38
II. Resultados e Discussão	39
2.1. Composição bioquímica da alga em fase reprodutiva.....	39
2.2. Composição Bioquímica da alga em fase não reprodutiva	41
Capítulo IV: Análise lipidómica.....	53
I. Materiais e Métodos	47
1.1. Análise e quantificação de ácidos gordos por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS).....	47
1.2. Análise de lípidos polares por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massa (HILIC-LC-Q-extrative-MS)	48
II. Resultados	49
2.1. Perfil de ácidos gordos da G. turuturu em fase reprodutiva	49
2.2. Perfil de ácidos gordos da G. turuturu em fase não reprodutiva	53
2.3. Estudo do perfil de lípidos polares da G. turuturu em fase não reprodutiva	59
Capítulo V: Atividade antioxidante de G. turuturu	85
I. Materiais e Métodos	79
1.1. Método de DPPH	79
II. Resultados e Discussão	81
Capítulo VI: Conclusão	91
I. Considerações finais.....	93
Bibliografia	87

Lista de Tabelas

Tabela 1 Estrutura geral de glicerofosfolípidos (esquerda) e diferentes classes de glicerofosfolípidos (direita)	Erro! Marcador não definido.
Tabela 2 Composição Bioquímica da <i>G. turuturu</i> em estado reprodutivo selvagem e de cultivo em IMTA (2 e 7 semanas) (média ± erro padrão).....	39
Tabela 3 Composição Bioquímica da <i>G. turuturu</i> em estado não reprodutivo selvagem e de cultivo em IMTA (2 e 7 semanas) (média ± erro padrão)	41
Tabela 4 Identificação dos iões $[M-H]^-$ de SQMG e SQDG observados no espectro de HPLC-MS e a sua composição em ácidos gordos. Os números entre parênteses (C: N) indicam o numero de átomos de carbono (C) e de duplas ligações (N) nas cadeias de ácidos gordos substituintes.....	62
Tabela 5 Identificação dos iões $[M+NH_4]^+$ de MGDG observados no espectro de HPLC-MS. Os números entre parênteses (C:N) indicam o numero de átomos de carbono (C) e de duplas ligações (N) nas cadeias de ácidos gordos substituintes.	65
Tabela 6 Identificação dos iões $[M-H]^-$ de PG e LPG observados no espectro de HPLC-MS. Os números entre parênteses (C:N) indicam o numero de átomos de carbono (C) e de duplas ligações (N) nas cadeias de ácidos gordos substituintes.	67
Tabela 7 Identificação dos iões $[M+H]^+$ de PC e LPC observados no espectro de HPLC-MS. Os números entre parênteses (C:N) indicam o numero de átomos de carbono (C) e de duplas ligações (N) nas cadeias de ácidos gordos substituintes; * não formou ião $[M+CH_3COO]^-$ e portanto não se determinou a composição em AG **não se obteve espectro MS/MS	70
Tabela 8 Identificação dos iões $[M+H]^+$ de PE observados no espectro de HPLC-MS. Os números entre parênteses (C:N) indicam o numero de átomos de carbono (C) e de duplas ligações (N) nas cadeias de ácidos gordos substituintes.	72
Tabela 9 Identificação dos iões $[M-H]^-$ de PA observados no espectro de HPLC-MS. Os números entre parênteses (C:N) indicam o numero de átomos de carbono (C) e de duplas ligações (N) nas cadeias de ácidos gordos substituintes.	72
Tabela 10 Identificação dos iões $[M-H]^-$ de IPC observados no espectro de HPLC-MS. Os números entre parênteses (C:N) indicam o numero de átomos de carbono (C) e de duplas ligações (N) nas cadeias de ácidos gordos substituintes.	73
Tabela 11 Identificação dos iões $[M+H]^+$ de DGTS e MGTS observados no espectro de HPLC-MS. Os números entre parênteses (C:N) indicam o numero de átomos de carbono (C) e de duplas ligações (N) nas cadeias de ácidos gordos substituintes.....	74
Tabela 12 Resultados do ensaio de DPPH para a determinação da atividade antioxidante	81

Lista de Figuras

Figura 1 Aspeto macroscópico da alga <i>G. turuturu</i> na fase reprodutiva (direita) e na fase não reprodutiva (esquerda).....	3
Figura 2 Ilustração do ciclo de vida haplodiplonte trifásico da <i>G. turuturu</i>	4
Figura 3 Gráfico representativo da distribuição aproximada dos diferentes compostos presentes na <i>G. turuturu</i> , estimada tendo em conta os valores da literatura (tabela 1)	7
Figura 4 Estrutura de uma carragenana constituída por unidades alternadas de β -D-galactose e de α -D-galactose, ou de 3,6-anidrogallactose. Adaptado de (3)	9
Figura 5 Transformação metabólica de PUFA n-3 e n-6 e os seus derivados (36).....	11
Figura 6 Estrutura geral das maiores classes de glicolípidos.....	14
Figura 7 Estrutura geral das inositol fosforil ceramidas (IPC)	15
Figura 8 Estrutura geral das três classes de betaínas.	16
Figura 10 Esquema representativo do desenho experimental do ensaio de crescimento da <i>G. turuturu</i> recolhida do ambiente selvagem e cultivada em IMTA. A azul estão representados os tanques utilizados e respetivos volumes. R: indivíduos em fase reprodutiva; NR: indivíduos em fase não reprodutiva; d: densidade de cultivo * semanas em que se recolheu amostra.....	26
Figura 11 Irradiância (abaixo) e Temperatura (acima) registadas ao longo das sete semanas de cultivo de <i>G. turuturu</i> (médias \pm erro padrão).	29
Figura 12 Taxa de crescimento relativo (média \pm erro padrão) da <i>G. turuturu</i> em fase reprodutiva cultivada em IMTA durante 7 semanas. 15L e 230L corresponde ao volume dos tanques utilizados para cultivo. DC $\bar{\alpha}$: média de densidade de cultivo.....	30
Figura 13 Produtividade (média \pm erro padrão) da <i>G. turuturu</i> em fase reprodutiva cultivada em IMTA durante 7 semanas.	31
Figura 14 Taxa de crescimento relativo (média \pm erro padrão) da <i>G. turuturu</i> em fase não reprodutiva cultivada em IMTA durante 7 semanas. 15L, 127 e 230L corresponde ao volume dos tanques utilizados para cultivo. DC $\bar{\alpha}$: média de densidade de cultivo.	31
Figura 15 Aparência de alguns indivíduos de <i>G. turuturu</i> em fase não reprodutiva após 7 semanas de cultivo em IMTA.....	32
Figura 16 Produtividade (média \pm erro padrão) da <i>G. turuturu</i> em fase reprodutiva cultivada em IMTA durante 7 semanas	33
Figura 17 Cromatograma obtido por GC-MS dos AG metilados da <i>G. turuturu</i> selvagem em fase reprodutiva. PI: padrão interno	50
Figura 18 Perfil de ácidos gordos da <i>G. turuturu</i> em fase reprodutiva durante o cultivo em IMTA, determinada por GC-MS de ésteres metilados de ácidos gordo. Média \pm erro padrão de triplicados. Nível de significância: **** p < 0.0001	50
Figura 19 Perfil de ácidos gordos da <i>G. turuturu</i> em fase reprodutiva em ambiente selvagem, determinada por GC-MS de ésteres metilados de ácidos gordo. Média \pm erro padrão de triplicados. Nível de significância: *p < 0.05 ** p < 0.01 ** p < 0.001 **** p < 0.0001	51
Figura 20 Perfil de ácidos gordos da <i>G. turuturu</i> em fase reprodutiva em diferentes ambientes determinada por GC-MS de ésteres metilados de ácidos gordo. Média \pm erro padrão de triplicados. Nível de significância: *p < 0.05 ** p < 0.01 ** p < 0.001 **** p < 0.0001	52
Figura 21 Percentagem de ácidos gordos saturados (SFA), monoinsaturados (MUFA) e polinsaturados (PUFA) nas algas de cultivo (acima) e selvagens (abaixo) da <i>G. turuturu</i> em fase não reprodutiva.	53
Figura 22 Cromatograma obtido por GC-MS dos AG metilados da <i>G. turuturu</i> selvagem em fase não reprodutiva. PI: padrão interno	54
Figura 23 Perfil de ácidos gordos da <i>G. turuturu</i> em fase não reprodutiva durante o cultivo em IMTA determinada por GC-MS de ésteres metilados de ácidos gordo. Média \pm erro padrão de triplicados. Nível de significância: **** p < 0.0001	54
Figura 24 Perfil de ácidos gordos da <i>G. turuturu</i> em fase não reprodutiva selvagem determinada por GC-MS de ésteres metilados de ácidos gordo. Média \pm erro padrão de triplicados. Nível de significância: **** p < 0.0001.....	55
Figura 25 Perfil de ácidos gordos da <i>G. turuturu</i> em fase não reprodutiva selvagem e em cultivo determinada por GC-MS de ésteres metilados de ácidos gordo. Média \pm erro padrão de triplicados. Nível de significância: ** p < 0.01 ** p < 0.001 **** p < 0.0001	56

Figura 26 Percentagem de ácidos gordos saturados (SFA), monoinsaturados (MUFA) e polinsaturados (PUFA) nas algas de cultivo (acima) e selvagens (abaixo) da <i>G. turuturu</i> em fase não reprodutiva.	57
Figura 27 Espectro de HPLC-MS das classes SQMG (A) e SQDG (B) obtidos no modo negativo com a formação de iões $[M-H]^-$ da <i>G. turuturu</i> após 7 semanas de cultivo em IMTA. Eixo do Y: abundancia relativa considerando o ião mais abundante como 100%; eixo do X: m/z de cada ião; PI: padrão interno.....	60
Figura 28 Estrutura geral dos SQDG (acima) e espectro MS/MS do SQDG em $[M-H]^-$ com m/z 839.49 (16:0/20:5) com as fragmentações padrão dos SQDG.....	61
Figura 29 Estrutura geral dos SQMG (acima) e espectro MS/MS do SQMG em $[M-H]^-$ com m/z 555.28 (16:0) com as fragmentações padrão dos SQMG.	61
Figura 30 Espectro de HPLC-MS das classes DGDG (A) e MGDG (B) obtidos no modo positivo com a formação de iões $[M+NH_4]^+$ da <i>G. turuturu</i> após 7 semanas de cultivo em IMTA. Eixo do Y: abundancia relativa considerando o ião mais abundante como 100%; eixo do X: m/z de cada ião;	63
Figura 31 Estrutura geral dos DGDG (acima) e espectro MS/MS do DGDG em $[M+NH_4]^+$ com m/z 956.63 (16:0/20:5) com as fragmentações padrão dos DGDG.....	64
Figura 32 Estrutura geral dos MGDG (acima) e espectro MS/MS do MGDG em $[M+NH_4]^+$ com m/z 956.63 (18:1/16:0) com as fragmentações padrão dos MGDG.	64
Figura 33 Espectro de HPLC-MS da classes PG obtido no modo negativo com a formação de iões $[M-H]^-$ da <i>G. turuturu</i> após 7 semanas de cultivo em IMTA. Eixo do Y: abundancia relativa considerando o ião mais abundante como 100%; eixo do X: m/z de cada ião;.....	66
Figura 34 Estrutura geral dos PG (acima) e espectro MS/MS do PG em $[M-H]^-$ com m/z 783.47 (16:0-OH/20:5) com as fragmentações típicas dos PG.	66
Figura 35 Estrutura geral dos LPG (acima) e espectro MS/MS do PG em $[M-H]^-$ com m/z 509.29 (18:1) com as fragmentações padrão dos LPG.....	67
Figura 36 Espectro de HPLC-MS da classes PC obtido no modo negativo com a formação de iões $[M+H]^+$ da <i>G. turuturu</i> após 7 semanas de cultivo em IMTA. Eixo do Y: abundancia relativa considerando o ião mais abundante como 100%; eixo do X: m/z de cada ião.....	68
Figura 37 Estrutura geral dos PC (acima), espectro MS/MS dos iões $[M+H]^+$ dos PC em com m/z 784.68 (18:1/18:2) (A) e espectro MS/MS dos iões $[M+CH_3COO]^-$ dos PC em com m/z 842.38 (18:1/18:2) (B) com as fragmentações padrão dos PC.	69
Figura 38 Estrutura geral dos LPC (acima), espectro MS/MS dos iões $[M+H]^+$ dos PC em com m/z 784.68 (18:1/18:2) (A) e espectro MS/MS dos iões $[M+CH_3COO]^-$ dos PC em com m/z 842.38 (18:1/18:2) (B) com as fragmentações padrão dos LPC.....	69
Figura 39 Estrutura geral dos PE (acima), espectro MS/MS do PE em $[M+H]^+$ com m/z 714.45 (A) e espectro MS/MS do PE em $[M-H]^-$ com m/z 714.48 (16:1/18:1 e 16:0/18:2) com as fragmentações padrão dos PE. .	71
Figura 40 Estrutura geral dos PA (acima) e espectro MS/MS do PA em $[M-H]^-$ com m/z 665.44 (14:0/20:5).	72
Figura 41 Estrutura geral dos IPC (acima) e espectro MS/MS do IPC em $[M-H]^-$ com m/z 920.62 com as fragmentações padrão dos IPC.	73
Figura 42 Estrutura geral dos DGTS (acima) e espectro MS/MS do DGTS em $[M+H]^+$ com m/z 738.61 com as fragmentações padrão.....	74

Lista de abreviaturas

AA - Ácido araquidónico

AG - Ácido gordo

DGDG - Digalactosildiacilglicerol

DGTS – Diacilgliceriltrimetil-homoserina

DPPH - 2,2-difenil-1-picril-hidrazil

EPA - Ácido eicosapentaenóico

FAO – do inglês, *food and agriculture organization*

FBP - Ficobiliproteínas

GL - Glicolípidos

HPLC – Cromatografia líquida de alta performance (do inglês *high performance liquid chromatography*)

IMTA - Aquacultura multitrófica integrada (do inglês *integrated multitrophic aquaculture*)

IPC – Inositolfosforilceramida (do inglês, *inositol phosphorylceramide*)

LC – Cromatografia líquida (do inglês *liquid chromatography*)

LPC – Lisfosfatidilcolina (do inglês, *lysophosphatidylcholine*)

LPG – Lisofosfatidilglicerol (do inglês, *Lysophosphatidylglycerol*)

m/z – Massa/carga

MGDG - Monogalactosildiacilglicerol

MGTS - Monoacilgliceriltrimetilhomoserina

MS – Espetrometria de massa (do inglês, *mass spectrometry*)

MS/MS – Espetrometria de massa *tandem*

PA - Ácido fosfatídico (do inglês, *phosphatidic acid*)

PC – Fosfatidilcolina (do inglês, *phosphatidylcholine*)

PE – Fosfatidiletanolamina (do inglês, *phosphatidyletanolamine*)

PG – Fosfatidilglicerol (do inglês, *phosphatidylglycerol*)

PL – Fosfolípidos (do inglês, *phospholipid*)

PUFA - Ácidos gordos polinsaturados (do inglês, *polyunsaturated fatty acids*)

RMN - Espetroscopia por ressonância magnética nuclear

ROS - Espécie reativa de oxigênio (do inglês, *reactive oxygen species*)

SQDG- Sulfoquinovosildiacilglicerol

SQMG- Sulfoquinovosilmonoacilglicerol

Capítulo I

Introdução

I. Introdução

As algas são uma das mais promissoras e sustentáveis fontes de biomassa para uma grande variedade de produtos. Atualmente as algas podem ser consumidas diretamente pelo homem ou processadas e utilizadas em nutrição animal, aditivos alimentares, fertilizantes, biocombustível, cosméticos e na medicina através, por exemplo, da produção de moléculas de alto valor comercial e/ou nutritivo como ácidos gordos, pigmentos, polissacarídeos, entre outros (3,2). Consequentemente, a procura de macroalgas aumentou bastante nos últimos anos, ultrapassando a capacidade de fornecimento dos *stocks* naturais. Desta forma, verificou-se um aumento das indústrias de cultivo de algas. Atualmente mais de 90% da procura de mercado é suprida por algas produzidas em aquacultura (*Food and Agriculture Organization* FAO 2010) e em 2012 as macroalgas representaram 26% da produção mundial de organismos cultivados (FAO 2014) (3, 4). Neste sentido a FAO elege a aquacultura como o setor de produção com maior crescimento do mundo apresentando um crescimento de 6,9% por ano (5).

A aquacultura é o termo referente à produção de organismos e plantas aquáticas para uso do Homem em diversas aplicações. A prática de aquacultura apresenta várias vantagens, sendo a diminuição da sob exploração dos recursos marinhos um dos fatores preponderantes. Para além disso, apresenta vantagens sociais às populações de inúmeros países onde este tipo de recursos marinhos não pode chegar em boas condições sanitárias e a preços razoáveis, mas também oferece perspectivas importantes de criação de emprego e de uma procura real pelos consumidores. Por outro lado, a libertação de azoto e fósforo das fezes dos animais que leva à eutrofização e ao desequilíbrio do ecossistema, e a fuga de animais/plantas que modificam o capital genético dos animais selvagens são alguns dos problemas que a aquacultura tradicional enfrenta. Assim, com a rápida expansão dos sistemas de aquacultura intensiva aumentou a preocupação ambiental e consequentemente despertou o interesse na aquacultura multitrófica integrada (IMTA) (6). A prática de IMTA combina, nas proporções certas, o cultivo de espécies em aquacultura com suplementação de alimento inerte (peixes) com espécies de aquacultura extrativa inorgânica (algas) e/ou orgânica (bivalves). O objetivo é aumentar a sustentabilidade e rentabilidade a longo termo da unidade de cultivo (e não da espécie, como acontece nas monoculturas) através da recaptação de alguns dos nutrientes e energia que são perdidos nas monoculturas de peixes transformando-os em cultivo com valor comercial (5). Desta forma, o sistema de IMTA propõe a integração de vários níveis tróficos no mesmo sistema de aquacultura permitindo a mitigação da libertação do desperdício da aquacultura (biomitigação) resultando na diminuição da pegada ecológica, diversificação económica e aumento da aceitação social dos sistemas de aquacultura. Estas características contrastam com as práticas mais antigas de

policultura, onde simplesmente se co-cultivava diferentes espécies do mesmo nível trófico levando a um desequilíbrio do ecossistema. Para além disso, IMTA é o único sistema de biomitigação que acrescenta valor comercial para o produtor uma vez que os outros métodos geralmente envolvem apenas custos. O IMTA tem sido utilizada para o cultivo de macroalgas, halófitas, moluscos, crustáceos e peixes. Nos últimos 20 anos a integração de macroalgas com aquacultura de peixes marinhos foi estudada e examinada no Canadá, Japão, Chile, Nova Zelândia, Escócia, Estados Unidos da América e Portugal (5). Atualmente, os géneros de algas de principal interesse e com grande potencial para o desenvolvimento em IMTA são *Laminaria*, *Saccharina*, *Sacchoriza*, *Undaria*, *Alaria*, *Ecklonia*, *Lessonia*, *Durvillaea*, *Macrocystis*, *Gigartina*, *Sarcothalia*, *Chondracanthus*, *Callophyllis*, *Gracilaria*, *Gracilariopsis*, *Porphyra*, *Chondrus*, *Palmaria*, *Asparagopsis* e *Ulva*. Estes géneros foram selecionados devido às suas capacidades de criação, adaptação ao habitat, capacidade de biomitigação e o seu valor económico (7). Atendendo a estas características, têm-se desenvolvido esforços para o cultivo de macroalgas em IMTA de outros géneros e espécies de algas.

A ALGAplus é pioneira no mercado nacional de produção e comercialização de macroalgas num sistema de IMTA desenvolvido em terra (*versus* sistemas *offshore*). A empresa está localizada em Ílhavo e aposta na produção sustentável e certificada como BIO de 6 espécies de algas presentes na costa portuguesa, as quais são posteriormente incorporadas em alimentos ou produtos de bem-estar. As algas produzidas pela empresa pertencem aos seguintes géneros: *Ulva*, *Porphyra*, *Palmaria*, *Chondrus*, *Codium* e *Gracilaria*. Simultaneamente, a ALGAplus trabalha na domesticação de novas espécies de algas nativas da costa portuguesa; a alga *Grateloupia turuturu*, é uma das espécies onde a empresa pretende aprofundar esta atividade.

A *Grateloupia turuturu* é uma macroalga vermelha comestível (na Ásia) com alto valor nutritivo e com potencial de comercialização e aplicação na indústria alimentar (pode ser usada diretamente como alimento ou os seus compostos podem ser extraídos e usados individualmente como ingredientes) e uso em farmacêutica, por exemplo, como anticoagulante através da ação das carragenanas (Figura 1). A *G. turuturu* é uma espécie não nativa que nos últimos anos tem apresentado uma rápida expansão na costa Portuguesa, mas sem impacto negativo nas comunidades de fauna e flora costeiras (8). Por estas razões, e sendo uma espécie com elevadas taxas de crescimento e adaptação a diferentes ambientes, a empresa ALGAplus pretende avaliar o potencial de exploração desta espécie, quer através de recolha das populações selvagens como através de cultivo integrado. Esta alga cresce em poças tanto em zonas abrigadas como expostas, na costa portuguesa a *G. turuturu* é encontrada essencialmente junto dos principais portos de navios. Esta alga pode tolerar uma larga variação de temperatura e salinidade tornando-a numa alga de fácil adaptação a diferentes ambientes o que explica a sua ampla difusão pelo mundo (8). É também reportada como

a maior alga vermelha e a espécie não nativa mais difundida do mundo (9,10). Ela é originária do Japão e pertence ao filo Rhodophyta, classe Florideophyceae, ordem Halymeniales e família Halymeniaceae. Anteriormente era também identificada erradamente como *Grateloupia doryphora*. A *G. turuturu* apresenta uma tonalidade castanha-avermelhada a rosada, e pode apresentar polimorfismos: talo formado por lâminas delgadas simples ou divididas; pequenas proliferações marginais, estreitas, pontiagudas e ramificadas e com estrutura interna filamentosa.



Figura 1 Aspeto macroscópico da alga *G. turuturu* na fase reprodutiva (direita) e na fase não reprodutiva (esquerda)

A sua estratégia de reprodução em ambiente selvagem é bastante eficiente uma vez que se reproduz rapidamente. O verão é a época do ano em que esta alga se reproduz e cresce mais, pelo contrário, no inverno a alga apresenta uma fase lenta no seu crescimento e reprodução, sendo difícil encontrar indivíduos desta espécie (8). No entanto a *G. turuturu* é capaz de se reproduzir durante todo o ano. A *G. turuturu* reproduz-se através de um ciclo de vida haplodiplonte trifásico (figura 2), incluindo duas fases reprodutivas isomórficas independentes (tetrasporófito (diploide) e gametófito (haploide)) e uma terceira fase reprodutiva (carposporófito). O zigoto diploide desenvolve-se parasitando o gametófito feminino, para originar uma segunda geração do aparelho vegetativo o carposporófito, produtor de carpósporos. Os carpósporos, por sua vez, dão origem a uma terceira geração independente, o tetrasporófito, cujo aparelho vegetativo é morfologicamente idêntico ao do gametófito, contudo é diploide. O tetrasporófito produz tetrasporócitos que libertam, após a meiose, tetrásporos os quais dão origem a novos gametófitos (11).

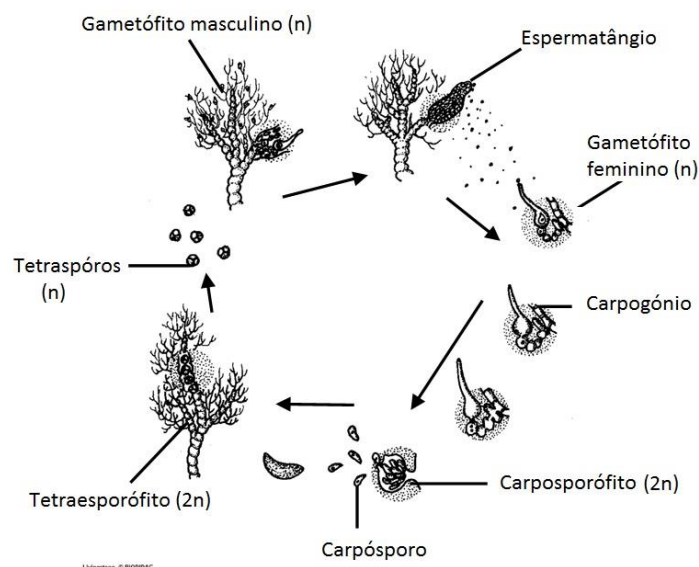


Figura 2 Ilustração do ciclo de vida haplodiplonte trifásico da *G. turuturu*

Nos países ocidentais estas algas são colhidas principalmente para produção de hidrocolóides como alginatos, agar ou carragenanas, que são comumente utilizados como aditivos alimentar devido às suas capacidades espessantes e gelificantes (12). Para além disso, esta alga é também rica em fibra dietética, proteínas e algumas vitaminas e ácidos gordos essenciais que lhe conferem valor nutricional. Porém, a maioria da *G. turuturu* utilizada para fins comerciais ainda provêm dos *stocks* selvagens; tendo em conta as tendências de aumento da exploração de macroalgas torna-se necessário explorar formas alternativas de obter biomassa, nomeadamente através de cultivo controlado (13). Neste sentido a empresa ALGAplus, pretende estudar o desenvolvimento desta alga em cultivo integrado, avaliando o seu potencial de produção e comparando a composição química de biomassa entre material selvagem e de cultivo.

1. Composição da *G. turuturu*

O estudo da composição das algas é de extrema importância uma vez que permite obter informação acerca do seu valor nutricional. Estudos realizados em algas demonstram claramente que a composição de uma alga varia de acordo com a espécie, área geográfica, estação do ano e condições ambientais (14,15). Mesmo considerando a mesma área geográfica observa-se que as condições de temperatura, salinidade e nutrientes dissolvidos variam durante o ano fazendo com que a composição da alga seja sazonal (16–18). Neste sentido, os estudos realizados na avaliação da composição da *G. turuturu* estão dependentes do local de recolha e altura do ano. Contudo através da análise de vários estudos consegue-se traçar um perfil geral da composição deste tipo de alga vermelha, como se apresenta na Tabela 1.

Tabela 1 Composição da *G. turuturu* em diferentes áreas geográficas onde se encontram representados o intervalo de percentagens de cada família de compostos durante o ano (% peso seco).

Referência	Origem	Proteína	Hidratos de Carbono	Lípidos	Cinzas
Perfeto (16)	Brasil	22,9-28,8 %	41,8-54,7 %	0,8-1,3 %	6,9-11,8 %
Denis <i>et al.</i> (19)	França	14,0-27,5%	58,1-62,7%	2,3-2,8 %	16,1-19,8%
Rodrigues <i>et al.</i> (20)	Portugal	22,5 % *	43,2 % *	2,2 % *	20,5 % *
Fujiwara <i>et al.</i> (21)	Japão	20 % *	-	-	-
Munier <i>et al.</i> (15)	França	24 % **	-	-	-
Kendel <i>et al.</i> (22)	França	-	-	3,3-4,1 %	-

*valores obtidos no mês de abril (primavera)

**valores obtidos para alga recolhida no mês de maio (primavera)

Perfeto (16) analisou a composição de *G. doryphra* (ou seja, *G. turuturu*) recolhida mensalmente durante um ano no Brasil. Este autor verificou que a *G. turuturu* apresentava valores altos de proteínas durante o inverno (28,8% peso seco) correspondendo este ao período de concentração máxima de amónia no ambiente marinho sugerindo que há uma utilização preferencial de amónia por esta alga para a síntese de proteínas. O teor mínimo de proteínas foi registado no verão onde apresentou uma percentagem de 22,9% peso seco. Já a variação do conteúdo em hidratos de carbono apresentou a relação inversa à de proteínas. Os valores máximos foram de 54,7% peso seco no verão e mínimos de 41,8% peso seco no inverno apresentando uma correlação positiva com a salinidade e temperatura da água do mar. Por sua vez o conteúdo de lípidos variou entre 0,81 e 1,3% peso seco mostrando relação direta com a quantidade de azoto no mar. A acumulação de lípidos nas algas normalmente é uma resposta à diminuição de azoto no meio ambiente e coincide também com o crescimento máximo da

alga. Já o conteúdo máximo de cinzas, fósforo e potássio ocorreu no outono e inverno com valores de 11,85% peso seco, 0,2% peso seco e 1,27% peso seco respectivamente. Verificou-se então que com o aumento da taxa de fotossíntese, observado no verão, há um aumento do conteúdo em hidratos de carbono e uma diminuição nas cinzas e proteínas.

Rodrigues *et al.* (20) determinaram a composição da *G. turuturu* da costa central portuguesa (Figueira de Foz) durante o mês de Abril, onde verificaram que as percentagens máximas dos principais componentes eram 22,5% peso seco de proteínas, 43,2% peso seco de açúcares, 2,2% peso seco de lípidos e 20,5% peso seco de cinzas. Por sua vez, Denis *et al.* (19) determinaram mensalmente a composição de *G. turuturu* recolhida na costa Francesa durante um ano, onde verificaram que a matéria seca representa aproximadamente 9,5% do peso fresco, valor este que é considerado baixo quando comparado com outras algas vermelhas. Em peso seco a *G. turuturu* apresentava uma composição de 18,5% de cinzas, 22,9% de proteína, 2,6% em lípidos totais e 60,4% de fibra dietética. Este nível de fibra dietética é considerado alto sendo que o conteúdo de fibra solúvel rondava os 48% de peso seco, percentagem superior do que em certas comidas como arroz escuro, cenouras ou bananas e perto da percentagem da soja (23). Já a fibra insolúvel constitui 12,4% do peso seco. Na generalidade verificaram que as proteínas eram o composto que mais variava ao longo do ano sendo o inverno a altura do ano em que apresentava maior percentagem. Dados estes que vão ao encontro do reportado por Garcia-Bueno *et al.* (24). Assim, a melhor altura do ano para recolher *G. turuturu* como fonte de proteína será no final do inverno e início da primavera. Outros estudos corroboram com os resultados acima reportados no que diz respeito ao teor de proteínas, como por exemplo Fujiwara *et al.* que reportam uma percentagem de 20% de massa seca de *G. turuturu* recolhida no Japão, e Munier *et al.* que verificaram que a mesma espécie de alga recolhida na costa francesa apresentava uma percentagem de 24% de teor de proteína de massa seca (15,21). Comparando com outros alimentos verificamos que este tipo de alga apresenta um teor proteico similar ao dos feijões (19-22%) ou carnes (18-25%) (20).

Quanto ao teor em lípidos Denis *et al.* (19) verificaram, tal como Perfeto (16) e Kendel *et al.* (22), que o teor de lípidos totais não variava significativamente ao longo do ano apesar das percentagens de lípidos totais registadas nos diferentes estudos variar bastante entre si, apresentado percentagens de 2,6% peso seco, 1,1% peso seco e 3,7% peso seco respectivamente. Tal como os lípidos o teor de fibra dietética solúvel (hidratos de carbono) não apresentou variações significativas ao longo do ano, o mesmo não acontece com a fibra insolúvel que mostrou estar mais elevada durante o inverno e início de primavera. Sendo assim, a altura ideal para recolher *G. turuturu* como fonte de fibra insolúvel, seria de Dezembro a Maio (19).

Resumindo, a *G. turuturu* apresenta uma grande quantidade de fibra dietética/ hidratos de carbono que representam mais de metade da percentagem de peso seco, apresenta também uma

quantidade considerável de proteínas, aproximadamente 25%, algumas cinzas e uma percentagem baixa de lípidos (por volta dos 2%). Na Figura 3 está representada a composição geral da *G. turuturu* fazendo uma aproximação tendo em conta os resultados obtidos em todos os estudos acima citados. A partir destes estudos podemos também perceber que consoante as aplicações que se pretende para a alga existe alturas do ano específicas em que esta deve ser recolhida. Por exemplo, se o intuito é extrair carragenanas da alga, então o período de dezembro a maio é o mais indicado uma vez que a fibra insolúvel (incluindo algumas carragenanas) tem os seus valores máximos. Para além disso verifica-se que os estudos são todos feitos em algas selvagens, não havendo, portanto, estudos relativos à composição desta alga produzida em aquacultura. De seguida irão ser apresentados os principais constituintes de cada grupo de compostos: proteínas, fibra dietética e lípidos.

COMPOSIÇÃO DE *G. TURUTURU*

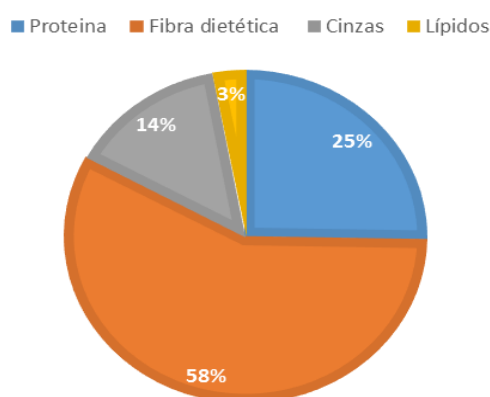


Figura 3 Gráfico representativo da distribuição aproximada dos diferentes compostos presentes na *G. turuturu*, estimada tendo em conta os valores da literatura (tabela 1)

1.1. Proteínas presentes na *G. turuturu*

As proteínas desempenham um papel muito importante em vários processos do corpo humano, desempenhando funções de catálise enzimática, transporte, suporte, movimento, regulação e armazenamento (25). Como acima citado a *G. turuturu* apresenta uma elevada quantidade de proteínas e aminoácidos. Os aminoácidos mais abundantes nesta alga vermelha são a arginina seguida de ácido aspártico, ácido glutâmico e leucina apresentando com valores similares a algumas leguminosas (21,26). Entre as proteínas presentes na *G. turuturu* é de ressaltar a presença de complexos proteína-pigmento, as ficobiliproteínas (FBP), uma vez que estas representam o maior constituinte proteico celular nas algas vermelhas (*Rhodophyta*) (27). As ficobiliproteínas para além de serem as proteínas celulares mais abundantes também apresentam interesse em várias aplicações biotecnológicas, nomeadamente técnicas de fluorescência. As FBP são as cromoproteínas hidrossolúveis com maior capacidade de captação de luz sendo por isso responsáveis pela coloração

da alga (pigmentos) (28). As FBP são formadas por um complexo proteico ligado covalentemente a um cromóforo, a ficobilina que captura a energia luminosa e transfere para a clorofila a durante o processo de fotossíntese (29). Existem vários tipos de FBP sendo que na *G. turuturu* podem ser encontradas a R-ficoeritrina que absorve entre 490-570 nm e a R-ficocianina que absorve entre 610-620nm (30). No Japão a R-ficoeritrina é extraída da alga e usada como corante alimentar e , para além disso, apresenta diversas aplicações biotecnológicas em imunologia, citometria de fluxo, entre outros (31,32). Denis *et al.* identificaram a presença de R-ficoeritrina e R-ficocianina na *G. turuturu* recolhida na costa francesa (33). Estes autores verificaram também que estas FBP apresentam uma variação semelhante às proteínas totais, com um pico máximo no inverno e mínimo no verão o que vai de encontro aos resultados obtidos por Galland-Irmouli *et al.* para a *Palmaria palmata* (34). Esta variação já era expectável uma vez que as FBP permitem estender a quantidade de luz absorvida e, portanto, são particularmente importantes em condições de luminosidade limitada. Desta forma como no inverno a luminosidade é baixa estes organismos adaptam-se a estas condições aumentando o número de FBP totais ou um certo tipo de FBP capazes de absorver o comprimento de onda prevalente no meio e desta forma aumentam a captação de luz (28).

1.2. Hidratos de carbono presentes na *G. turuturu*

A maioria dos hidratos de carbono presentes na *G. turuturu* fazem parte da fibra dietética (polissacarídeos) presente na alga sendo que a fibra dietética representa cerca de metade do peso seco da alga. Como anteriormente referidos estas algas vermelhas apresentam um alto teor em carragenanas (também considerada fibra dietética pois não são digeridos no trato gastrointestinal) sendo este um dos principais compostos extraídos da alga para uso na indústria alimentar como aditivo devido às suas propriedades gelificantes e espessantes. As carragenanas são uma família de galactanas, mais especificamente são polissacarídeos lineares sulfatados constituídos por polímeros de β -D-galactose ligados glicosidicamente através de ligações α -1,3 e β -1,4 alternadamente (Figura 4) (35). Existem vários tipos de carragenanas diferenciadas pela sua estrutura: carragenana κ , ι , μ , ν , ω , λ , ϵ , θ , entre outras, contudo as carragenanas κ , ι e λ são as mais usadas como aditivos contendo entre 22 a 35 % de grupos sulfato. Um nível elevado de sulfatação diminui a temperatura de solubilidade e consequentemente produz géis mais fracos (λ - carragenana). Desta forma as κ - carragenanas são as mais indicadas para fazerem géis enquanto as λ -carragenanas mais indicadas como espessante.

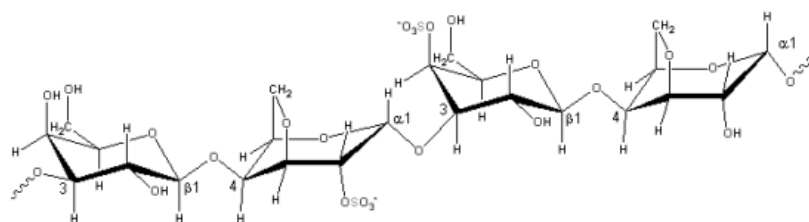


Figura 4 Estrutura de uma carragenana constituída por unidades alternadas de β -D-galactose e de α -D-galactose, ou de 3,6-anidrogallactose. Adaptado de (3)

Para além das carragenanas existe também outra família de galactanas sulfatadas presente nesta alga, o agar. O agar é constituído por agarose e agarpectina. A agarose é o componente predominante do agar, e é um polímero linear constituído por unidades monoméricas de agarobiose. A agarobiose é um dissacarídeo constituído por D-galactose e 3,6 anidro-L-galactose e a agarpectina é constituída por unidades de D-galactose e L-galactose. Uma outra fibra dietética presente em algas é a celulose uma vez que é um dos principais constituintes da parede celular. A celulose é uma fibra dietética insolúvel composta por monómeros de glucose ligados através de ligações β -1,4. Denis *et al.* confirmaram a presença de celulose, agar, carragenana κ e ι através da digestão enzimática da alga onde verificaram que a κ -carragenana é muito mais abundante que a ι (33). Este estudo demonstrou que as carragenanas presentes na alga são as mais gelificantes sendo, portanto indicadas para fazer gelatinas, pudins, entre outros.

1.3. Lípidos presentes na *G. turuturu*

Os lípidos são um grupo de compostos diversificados que apresentam insolubilidade em água. Os lípidos apresentam várias funções no organismo sendo as principais o armazenamento de energia e a função estrutural das membranas (25). Existem dois grandes grupos de lípidos: os lípidos polares e os lípidos apolares. Ao grupo dos lípidos apolares pertencem os ácidos gordos livres, os triacilgliceróis e os esteróis e o grupo de lípidos polares é constituído por fosfolípidos, glicolípidos e betaínas (36). A lipidómica é um ramo pertencente a um campo de estudo mais alargado, a metabolómica, dado que os lípidos são metabolitos biológicos. Mas por si só a lipidómica é uma disciplina distinta devido às funções únicas e distintas dos lípidos em relação aos outros metabolitos. A lipidómica pode ser definida como o estudo sistemático e de larga escala da estrutura, função e interação de lípidos nos sistemas biológicos. A lipidómica engloba também o estudo de alterações lipídicas que ocorrem em resposta a mudanças ambientais ao longo do tempo. Para isso são utilizadas

várias técnicas modernas de espectrometria já que este é um campo relativamente novo e em rápida expansão (37,38).

No que diz respeito à composição em lípidos, podemos encontrar na literatura vários estudos que reportam a caracterização lipídica em *G. turuturu* selvagem. Apesar de ser uma família de compostos minoritária na alga, apresentam grande interesse uma vez que esta espécie de alga apresenta um elevado teor de ácidos gordos polinsaturados (PUFA), glicolípidos (GL) e fosfolípidos (PL), que possuem várias atividades biológicas (39–41). De seguida irá ser apresentada a composição em ácidos gordos (AG) e lípidos polares reportados na literatura para a *Grateloupia turuturu*.

1.3.1. Ácidos gordos presentes na *G. turuturu*

Os AG podem ser classificados em AG saturados (sem duplas ligações, SFA), monoinsaturados (com uma dupla ligação, MUFA) e polinsaturados (com duas ou mais insaturações, PUFA). O corpo humano é capaz de sintetizar SFA e MUFA, mas não é capaz de sintetizar PUFA e desta forma estes são considerados AG essenciais. Sabe-se que o consumo de AG essenciais para o ser humano é extremamente importante uma vez que estes não são biossintetizados pelo corpo para além de apresentarem um papel extremamente importante no sistema imunitário. Os AG essenciais são considerados alimentos funcionais e nutracêuticos com vários benefícios para a saúde incluindo a capacidade de redução do risco de doenças cardiovasculares, cancro, osteoporose e diabetes. Existem dois grupos biologicamente importantes de AG essenciais: os *n*-3 e os *n*-6, de acordo com a posição da primeira ligação dupla a partir do terminal metilo. Na figura 5 estão demonstradas as transformações que ocorrem nos PUFA *n*-3 e *n*-6 para originar os seus derivados como as prostaglandinas (PG), leucotrienos (LK) e tromboxanos (TX). Os precursores primários dos PUFA *n*-3 e *n*-6 são o ácido α linolénico (ALA) e o ácido linoleico (LA), respetivamente. Estes precursores têm de ser consumidos na dieta devido à falta de Δ^{12} e Δ^{15} dessaturase necessárias para a síntese de ALA a partir de ácido esteárico (18:0). A conversão do ALA da dieta em ácido eicosapentaenóico (EPA) é limitado uma vez que o ALA e LA competem para as mesmas enzimas, no entanto a afinidade da Δ^6 dessaturase ao ALA é superior ao LA. Os PUFA *n*-3 apresentam efeito cardioprotetor resultante da atividade anti trombótica, anti-inflamatória, antiarrítmica, entre outras (40,42,43). Enquanto que os PUFA *n*-6 aumentam a síntese de colesterol, aumentam os recetores de LDL e apresentam uma atividade pró-inflamatória. Neste sentido é necessário um balanço entre o consumo de *n*-3 e os *n*-6 de modo a prevenir doenças cardiovasculares e outras doenças crónicas como a diabetes, hipertensão e doenças autoimunes (44).

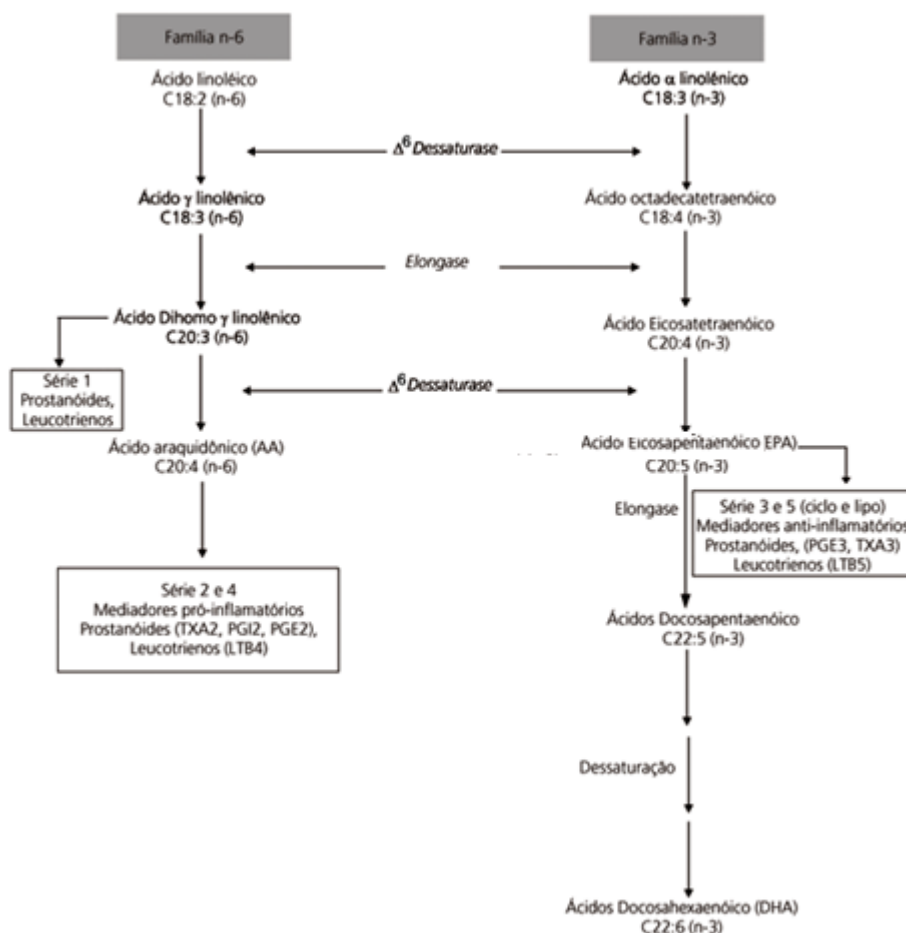


Figura 5 Transformação metabólica de PUFA *n*-3 e *n*-6 e os seus derivados (36).

Na literatura Kendel *et al.* verificaram que o teor total de lípidos da *G. turuturu* estava entre 3.3 e 4.1% sendo que 20.4 a 31.1% são PUFA(45). Paralelamente Kumari *et al.* verificaram que esta alga é rica nos AG essenciais como 20:4n-6 (ácido araquidônico) e 20:5n-3 (ácido eicosapentaenóico) (40). Já um estudo de Denis *et al.* determinou que a fração de ácidos gordos é constituída por 68% de AG saturados, 12% monoinsaturados e 19% de PUFA (19). O nível de AG saturados verificou-se ser maior do que o reportado por Hotimchenko *et al.* que reportou 33-40% da fração de AG (17). O AG mais abundante foi o ácido palmítico (16:0) que constitui cerca de 52% da fração de AG. Neste estudo foi evidenciado novamente que a *G. turuturu* apresenta PUFA como o ácido linolênico (18:3n-3), ácido linoleico (18:2n-6), ácido araquidônico (20:4n-6, AA) e ácido eicosapentaenóico (20:5n-3, EPA) sendo este último o PUFA maioritário representando 12% da fração de AG. O valor de EPA mostrou-se inferior ao reportado por Hotimchenko *et al.* que

evidenciou a presença de 22,6% de 20:5n-3(17). Foi também detectado pela primeira vez em *G. turuturu* o AG 3-hidroxi-C17 reportado como um AG típicos de bactéria. A percentagem de AG saturados determinada foi maior em agosto enquanto a percentagem de AG insaturados foi maior em fevereiro. O EPA atingiu a máxima concentração em Fevereiro e os níveis de ácido araquidônico mantiveram-se elevados entre fevereiro a junho (19). Num outro estudo Hotimchenko *et al.* estudaram a variação dos ácidos gordos em função da luminosidade estabelecendo uma relação entre esta variação e uma resposta adaptativa da alga à iluminação (17). Desta forma verificaram que algas (recolhidas no mar do Japão) expostas a menor quantidade de luz eram 3.6 vezes mais ricas em lípidos totais do que as expostas a mais iluminação (17), sendo que algas expostas a mais iluminação apresentavam um conteúdo de AG saturados (14:0, 16:0, 18:0) menor e maior quantidade de um dos PUFA mais abundantes (20:5n-3). Estes resultados sugerem que parte do ácido eicosapentaenóico na *G. turuturu* é formado a partir do ácido araquidônico como acontece na microalga *Porphyridium cruentum*. Neste caso o aumento da intensidade luminosa afeta positiva e especificamente a $\Delta 17$ dessaturase, enzima que participa na formação de 20:5(n-3) a partir de 20:4(n-6) nos cloroplastos (46).

Kendel *et al.* identificaram outros compostos lipídicos de interesse como o escaleno (conhecido pela capacidade de aumentar a eficiência do sistema imunitário e por baixar os níveis de colesterol, e por ter efeito antioxidante (47)), o tocoferol (também conhecido como vitamina E, é um importante antioxidante natural (48)), vitamina K1, e vários esteróis com composição variável durante o ano sendo que o colesterol era o mais abundante (22). O formato de colesteril, colest4-en3-ona foi encontrado pela primeira vez nesta alga (49). Este composto resulta da biossíntese ou autooxidação do colesterol e segundo Suzuki *et al.* este composto tem um efeito anti obesidade em animais (50). Também o colest4,5dien-3-ona foi identificado pela primeira vez em algas, este composto é normalmente utilizado como intermediário na síntese de vários derivados esteroidais (22). Já o AG hidroxihexadecanóico foi identificado pela segunda vez nesta alga apesar de ser um AG típico de bactérias (19). Num outro estudo Plougrouné *et al.* identificaram o formato de colest-5-en-3-ol pela primeira vez, um composto com propriedades bioativas que se pensa ser específico desta alga (49). Para além disso Kendel *et al.* verificaram também que os AG saturados são os lípidos mais abundantes (60.4%) seguido dos PUFA (25%), resultados que corroboram com os apresentados por Denis *et al.* (19). Neste estudo evidenciaram também que o AG mais abundante foi o palmítico representando 45% dos AG totais percentagem esta que se encontra um pouco abaixo da apresentada por Denis *et al.* e Hotimchenko *et al.* (17,19). Na tabela 2 estão representados os lípidos encontrados na *G. turuturu* nos estudos acima citados.

Tabela 2 Compilação dos lípidos encontrados na *G. turuturu* em três estudos

Hidrocarbonetos	Esteróis	Ácidos gordos	Outros
n-tricosano ⁽²²⁾	22(<i>E</i>)- dehidrocolesterol ⁽²²⁾	14:0 ^(17,19,22)	x-tocoferol ⁽²²⁾
n-tetracosano ⁽²²⁾	Colesterol ⁽²²⁾	15:0 ^(17,19,22)	Fitonadiona ⁽²²⁾
n-pentacosano ⁽²²⁾	Colestanol ⁽²²⁾	16:0 ^(17,19,22)	Fitol ⁽²²⁾
n-hexacosano ⁽²²⁾	Latosterol ⁽²²⁾	18:0 ^(17,19,22)	
n-hetpacosano ⁽²²⁾	Brassicasterol ⁽²²⁾	16:1n-7 ^(17,19,22)	
n-octacosano ⁽²²⁾	22-dehidrolatosterol ⁽²²⁾	<i>trans</i> 16:1 ^(17,19,22)	
n-nonacosano ⁽²²⁾	Condriasterol ⁽²²⁾	18:1n-9 ^(17,19,22)	
n-triacosano ⁽²²⁾	Fucoesterol ⁽²²⁾	18:1n-7 ^(17,19,22)	
n-hentriacosano ⁽²²⁾	Colest-4-en-3-ona ⁽²²⁾	16:3 ^(17,19,22)	
Esqualeno ⁽²²⁾	Colesta-4,6-dien-3-ona ⁽²²⁾ Colest-5-en-3ol ⁽⁴⁹⁾	18:2n-6 ^(17,19,22)	
		18:3n-3 ^(17,19,22)	
		18:3 n-6 ^(17,19,22)	
		20:3 n-6 ^(17,19,22)	
		20:4 n-6 ^(17,19,22)	
		20:5n-3 ^(17,19,22)	
		3-OH-17:0 ^(17,19,22)	

1.1.1. Lípidos polares presentes em algas vermelhas

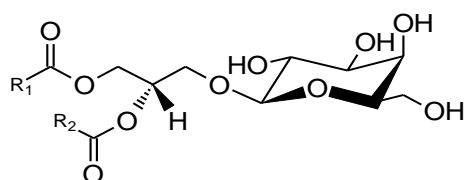
Glicerofosfolípidos e Glicolípidos

Os glicerofosfolípidos e glicolípidos são os dois grupos maioritários de lípidos polares presentes nas algas vermelhas (36,51). Os glicerofosfolípidos também chamados de fosfolípidos são lípidos membranares com dois AG ligados por uma ligação éster na posição *sn*-1 e *sn*-2 da cadeia de glicerol e na posição *sn*-3 apresenta uma cabeça polar com um grupo carregado ligado através de uma ligação fosfodiéster. Existem várias classes de glicerofosfolípidos dependendo do álcool polar ligado à cabeça polar (tabela 3).

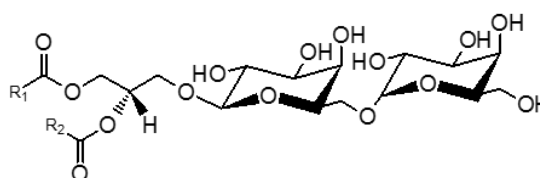
Tabela 3 Estrutura geral de glicerofosfolípidos (esquerda) e diferentes classes de glicerofosfolípidos (direita)

$ \begin{array}{c} \text{O} \\ \parallel \\ \text{H}_2\text{C}-\text{O}-\text{C}-\text{R}_1 \\ \\ \text{HC}-\text{O}-\text{C}-\text{R}_2 \\ \\ \text{H}_2\text{C}-\text{O}-\text{P}(\text{O}_2)\text{O}-\text{X} \end{array} $	Classe de glicerofosfolípidos	Grupo polar (X)
	Ácido fosfatídico	- H
	Fosfatidiletanolamina	- CH ₂ - CH ₂ - ⁺ NH ₃ (etanolamina)
	Fosfatidilcolina	- CH ₂ - CH ₂ - ⁺ N(CH ₃) ₃ (colina)
	Fosfatidilserina	- CH ₂ - CH(COO ⁻) - ⁺ NH ₃ (Serina)
	Fosfatidilglicerol	-CH ₂ - CH(OH) - CH ₂ - OH (glicerol)

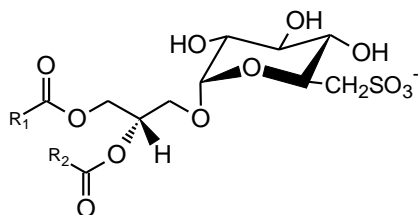
Os glicolípidos estruturalmente são semelhantes aos fosfolípidos, contudo em vez do grupo fosfato ligado na posição *sn*-3 da cadeia de glicerol apresentam um açúcar simples ou um oligossacarídeo na cabeça polar. Nas algas vermelhas os glicolípidos mais abundantes são os monogalactosildiacylgliceróis (MGDG). Os digalactosildiacylgliceróis (DGDG), sulfoquinovosildiacylgliceróis (SQDG) e os sulfoquinovosilmonoacylgliceróis (SQMG) (Figura 6). Os glicolípidos são lípidos estruturais presentes nas membranas dos cloroplastos e tilacoides funcionando como marcadores para reconhecimento celular e fornecimento de energia (39).



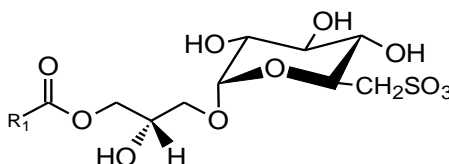
Monogalactosildiacylgliceróis (MGDG)



Digalactosildiacylgliceróis (DGDG)



Sulfoquinovosildiacylgliceróis (SQDG)



Sulfoquinovosilmonoacylgliceróis (SQMG)

Figura 6 Estrutura geral das maiores classes de glicolípidos

Esfingolípídeos

Os esfingolípídeos ou ceramidas são compostos por três partes: a base de esfingosina, o ácido gordo e o grupo polar. Já foram identificados vários esfingolípídeos em algas. Em algas vermelhas Khotimichenko *et al.* identificaram em 44 espécies um esfingolípídeo contendo inositol, inositol fosforilceramida, IPC (Figura 7) (52). O autor reporta este esfingolípídeo como sendo um marcador taxonômico das algas vermelhas já que não foi identificado nem nas algas verdes ou castanhas.

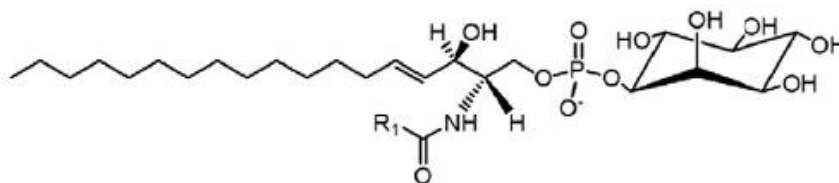


Figura 7 Estrutura geral das inositol fosforil ceramidas (IPC)

Betaínas

As betaínas são um grupo de lípidos polares presentes nas algas marinhas que apresentam uma função estrutural e funcional (53,54). As betaínas são glicolípídeos que apresentam ligada à posição *sn*-3 da cadeia de glicerol um álcool de amina quaternária e dois ácidos gordos esterificados ligados na posição *sn*-1 e *sn*-2. As betaínas como na sua estrutura não apresentam fosforo como os fosfolípídeos nem hidratos de carbono como os glicolípídeos são classificados como lipoaminoácidos. Atualmente, existem 3 tipos de betaínas, cada uma contendo diferentes hidroxiaminoácidos trimetilados: 1,2-diacilgliceril-3-*O*-4'-(*N,N,N*-trimetil)-homoserina (DGTS), 1,2-diacilgliceril-3-*O*-2'-(hidroximetil)-(*N,N,N*-trimetil)- β -alanine (DGTA) e 1,2-diacilgliceril-3-*O*-carboxi-(hidroximetil)-colina (DGCC) (55). Para além disso as betaínas podem ser encontradas na sua forma liso, ou seja, apenas com um AG. As betaínas já foram identificadas em algumas espécies de algas vermelhas apesar de em baixa quantidade *Lomentaria articulata* *Mastocarpus stellatus*, *Phyllophora pseudoceranoides*, *Membranoptera alata* e *Phycodrys rubens* (56).

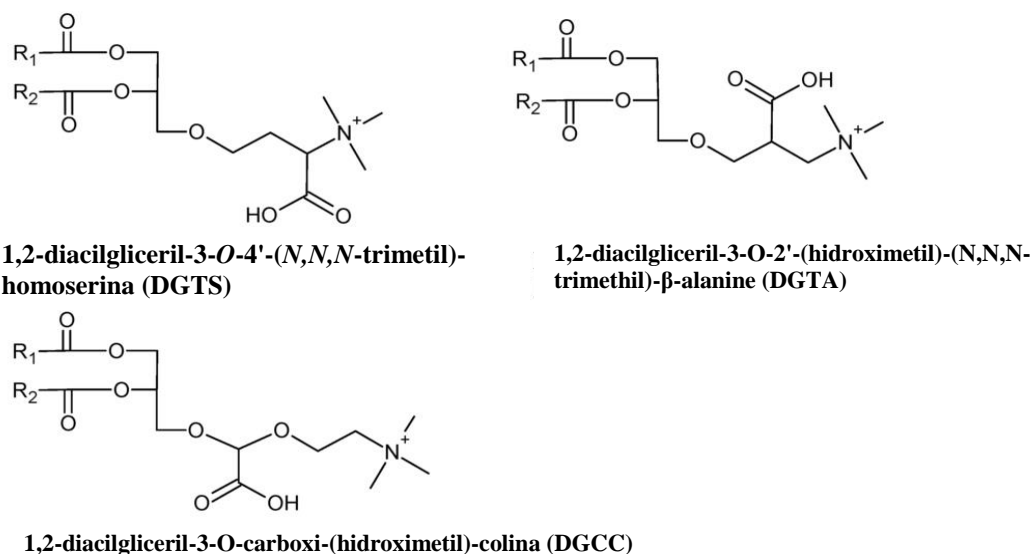


Figura 8 Estrutura geral das três classes de betaínas.

Relativamente à *G. turuturu* existe apenas um estudo que identificou e quantificou os glicolípidos (GL) e fosfolípidos (PL) evidenciando a composição de cada classe de PL ao longo do ano, em alga selvagem, recolhida em França. Os lípidos polares foram separados por coluna sílica gel, as classes de lípidos foram separadas e identificadas por TLC e a composição das classes de fosfolípidos foi analisada por HPLC. Assim, os resultados permitiram identificar apenas as classes presentes, mas não deram informação sobre as espécies moleculares de cada classe (22). Verificou-se que a maior classe de lípidos na *G. turuturu* são os GL que são a classe de lípidos com potencial atividade biológica em macroalgas, tais como atividade antimicrobiana, antiviral e anti-inflamatória, embora provado para GL de outras macroalgas, incluindo algas vermelhas (34,41,57). A quantidade de GL, cerca de 45%, mostrou-se ser um pouco inferior quando comparada com outras espécies de algas vermelhas, que é de cerca de 50-70% dos lípidos totais (40,41). As classes de PL mais abundantes foram as fosfatidilcolinas (PC) e as fosfatidilserinas (PS) e as maiores classes de GL foram mono- e di- galactosildiacylgliceróis (45).

Os mesmos autores, Kendel *et al*, num outro estudo separaram por sílica em gel as classes de lípidos e através de GC-MS identificaram o perfil de AG dos PL e dos GL ao longo do ano (45). Estes autores verificaram que PUFA ocorrem acima dos 47.1% (verão) em PL e acima de 43.6% (verão) em GL, valores superiores aos reportados para alguns óleos de peixe (60). Os autores comprovaram que o PUFA maioritário neste grupo de lípidos polares era o 20:5(*n*-3) (2.2 % em PL e 29% em GL) e o 20:4*n*-6 (25.6% em PL e 10.4% em GL) (45). Outros ácidos gordos insaturados de cadeia menor foram identificados pela primeira vez nesta alga, que são pouco comuns em macroalgas, nomeadamente o 14-tricosenoico, 15-tetracosenoico, 5,11-octadecadienoico e 5,9-nonadecadienoico que são normalmente encontrados em invertebrados marinhos. Também foi

detetado o ácido 3-hidroxihexadecanoico sendo estes AG constituinte das membranas sendo capaz de influenciar as propriedades membranares, por exemplo, a baixas temperaturas algumas algas modificam a sua composição de AG membranares aumentando a quantidade deste AG de modo a manter a viscosidade funcional das suas membranas (61) .

De um modo geral, verifica-se que a *G. turuturu* apesar de apresentar um teor baixo em lípidos totais contém elevadas quantidades de AG de extrema importância para a saúde, nomeadamente os PUFA ómega 3. Para a utilização desta alga como fonte de lípidos demonstrou-se que não existem variações significativas durante o ano no teor de lípidos totais para a mesma região, contudo a área geográfica e as condições de iluminação podem influenciar a quantidade e o tipo de lípidos presentes na sua composição uma vez que se verificou uma grande variação entre os dados dos diferentes autores.

2. Propriedades biológicas da *G. turuturu*

2.1. Propriedade Anti-fouling

As diversidades de metabolitos presentes em algas fazem com que estas possuam propriedades bioativas interessantes e que valem a pena serem estudadas devido às diversas aplicações possíveis. A *G. turuturu* não foge à regra e desta forma apresenta alguns compostos que lhe conferem algumas propriedades interessantes das quais se destacam as suas propriedades anti-fouling, antibacterianas, anticoagulantes, antivirais e de fibra dietética. As primeiras duas propriedades acabam por estar relacionadas uma vez que o fouling é um problema que toda a superfície submersa em água salgada (ou doce) enfrenta uma vez que é rapidamente colonizada por um biofilme de microrganismos que geram uma camada de sujidade. As macroalgas são particularmente propensas às epífitas (organismos que crescem na superfície das algas sem retirar seus nutrientes) e a colonização das mesmas nas suas superfícies pode levar a perturbações severas e até mesmo morte do hospedeiro. Para se protegerem contra a colonização, diversas algas desenvolvem mecanismos de defesa contra esta sujidade (fouling) através da produção de uma grande variedade de metabolitos. Assim, a capacidade de eliminar bactérias (capacidade antimicrobiana) pode contribuir para a diminuição do microfouling, contudo nem todo o fouling provém de bactérias e desta forma convém distinguir estas duas propriedades. No que diz respeito às restantes propriedades a atividade antiviral e antioxidante foram as menos estudadas e por isso apresentam menos evidências, contudo são propriedades de grande interesse que vale a pena ser mencionado.

A capacidade anti-fouling é bastante útil em aplicações da indústria nomeadamente de tintas de barcos uma vez que estas superfícies são muito propensas ao *microfouling*. Neste sentido vários estudos foram feitos e demonstraram que a *G. turuturu* aparenta ser anti-*microfouling*, sendo propriedade conferida através dos seus metabolitos secundários como forma de defesa.

Hellio *et al.* reportaram que o ácido isetiônico e o floridosido presentes na composição desta espécie de *Grateloupia* conferem a capacidade anti-fouling contra a *cyprid larvae* de *Balanus amphitrite* que é a fase inicial do crescimento de um crustáceo que se encontra normalmente incrustado em rochas, conchas e corais para além de parasitar um grande número de invertebrados e vertebrados (62). O ácido isetiônico está também presente nos mamíferos sendo que no reino vegetal só foi encontrado em algumas algas vermelhas e sendo um anião que pode substituir o Cl^- pensa-se que este esteja envolvido com a osmolaridade. Já o floridosido é considerado ser o principal produto fotossintético das algas vermelhas tendo já sido provado ser um dos solutos envolvidos na resistência ao stress osmótico (63). Também Simon-colin *et al.* descreveram a presença destes dois compostos na *G. turuturu* e identificaram a presença de sulfóxido N-metil-L-metionina que já tinha sido também reportada por Miyazawa *et al.* (64). Nesse estudo os autores realçaram a importância destes solutos orgânicos para a adaptação da alga a diferentes salinidades uma vez que apresentam uma função osmoregulatória (65). Contrariamente Plouguerné *et al.* verificaram que o extratos de diclorometano eram os que apresentavam maior atividade antimicrobiana nomeadamente contra três espécies de bactérias *Cobetia marina*, *Pseudoalteromonas elyakovii*, *Shewanella putrefaciens*, duas microalgas *Exanthemachrysis gayraliae*, *Navicula jeffreyii* e diversas estirpes de fungos que costumam estar na origem do anti-*microfouling* (66). Estes resultados indicam que as algas apresentam compostos que afetam especificamente os fungos uma vez que o crescimento de um largo espectro de espécies foi inibido. O mesmo autor reporta que o formato de colest-5-en-3-ol pode ser um dos responsáveis por esta atividade (67).

De forma sucinta, ainda não se conhece ao certo os compostos responsáveis pela atividade anti-fouling, enquanto alguns estudos apontam para compostos hidrossolúveis outros afirmam que é a fração hidrofóbica que contribui para esta atividade. Contudo ambos os estudos podem estar corretos e a atividade anti-fouling ser adquirida pela atuação de vários compostos que atuam sinergicamente.

2.2. Propriedade antibacteriana

A propriedade antibacteriana desta alga tem sido bastante estudada e vários estudos apontam para uma inibição significativa de algumas espécies de bactérias. Num desses estudos Garcia-bueno *et al.* verificaram que extratos hidrossolúveis de *G. turuturu* recolhida na costa francesa com concentrações de $10\mu\text{g}\mu\text{l}^{-1}$ apresentavam inibições de crescimento de *Vibrio harveyi*, com variações

sazonais entre 0 e 16% (24), sendo esta atividade mais forte na primavera (entre Abril e Junho) e a mais fraca no Verão. O nível mais baixo de atividade bactericida durante o verão pode ser explicado pelo aumento da temperatura da água do mar que pode modificar a produção de metabolitos (68). Contudo o estudo de Garcia-bueno *et al.* não conseguiu relacionar as variações de inibição com os picos presentes no espectro RMN dos compostos maioritários detetados na alga (hidratos de carbono e proteínas), sugerindo que esta atividade antibacteriana resulta da presença de um composto minoritário que não conseguiu identificar (24). Anteriormente Plouguerné *et al.* já tinham demonstrado que o composto formato de colesterilo, um lípido minoritário encontrado pela primeira vez em *G. turuturu* da costa britânica, apresentava atividade antibacteriana (67). Por outro lado, Garcia-bueno *et al.* avaliaram também a atividade dos extratos da espécie *P. palamata* (outra espécie de alga vermelha) onde verificaram que estes não eram efetivos contra o organismo patogénico testado. Desta forma este estudo confirmou a capacidade bactericida dos extratos hidrossolúveis e polares de *G. turuturu* contra *V. harveyi* (24).

Segundo Pang *et al.* (69) cerca de 70% dos indivíduos de *G. turuturu* recolhidos na costa chinesa inativavam a bactéria *Vibrio parahaemolyticus* na presença de luz, mostrando que a capacidade de colonização das bactérias diminuía significativamente na presença desta alga quando comparada com outras três algas. Este autor sugere que este efeito se deva à libertação de peróxido de hidrogénio (H_2O_2) ou outra ROS produzida metabolicamente pela alga. O NADPH que resulta da fotossíntese é necessário para a produção de H_2O_2 daí o processo ser dependente de luz (69).

Perante os estudos apresentados observa-se que a *G. turuturu* apresenta atividade antibacteriana para as espécies *Vibrio parahaemolyticus* e *V. harveyi*. Vários compostos foram sugeridos como responsáveis por esta atividade sendo o H_2O_2 e o formato de colest-5-en-3-ol os que se destacam.

2.3. Propriedade anticoagulante

A propriedade anticoagulante associada a esta alga provém da quantidade elevada de carragenanas que as algas vermelhas apresentam. Neste sentido, vários estudos reportaram que as carragenanas apresentam atividade anticoagulante tendo por base principalmente a propriedade antitrombótica (53, 54). Como referido anteriormente, existem vários tipos de carragenanas sendo que na *G. turuturu* predomina é a κ -carragenana seguido da ι -carragenana. As principais classes de carragenanas como anticoagulantes são a κ e a λ (72). O mecanismo proposto para a atividade anticoagulante das carragenanas desencadeia-se através da via de inibição da trombina através da inibição da amidólise da trombina diretamente ou através da via anti trombina III, a mesma via em que atua a heparina (73). A λ -carragenana mostrou ter o maior poder anticoagulante num estudo de Hawkins *et al.* contudo esta carragenana apresentou atividade abaixo da heparina (composto mais usado como anticoagulante) (70). Por outro lado, Sen *et al.* verificaram que estas galactanas

sulfatadas apresentavam atividade anticoagulante semelhante à heparina, contudo o estudo foi realizado em outra espécie de *Grateloupia* (74).

Os estudos realizados usam carragenanas de outras algas vermelhas, desta forma serão necessários estudos posteriores que estudem especificamente as carragenanas presentes na *G. turuturu*. Contudo, tendo em conta que a *G. turuturu* apresenta abundância em κ -carragenana e já foi demonstrado que este tipo de carragenana tem atividade anticoagulante pode prever-se que as carragenanas presentes na *G. turuturu* também possuam a mesma atividade.

2.4. Atividade antiviral da *G. turuturu*

A atividade antiviral da *G. turuturu* ainda não foi muito estudada, porém existem algumas evidências da presença desta atividade. Hudson *et al.* avaliaram a atividade antiviral de treze espécies de algas (incluindo *G. turuturu*) recolhidas na costa coreana (75). Este estudo analisou o desempenho dos extratos, diluídos em metanol, contra três vírus (*herpes simplex*, vírus sindbis e poliovírus) na presença e na ausência de luz. A *G. turuturu* mostrou apenas atividade contra o vírus sindbis, um vírus de RNA com membrana. A concentração mínima à qual a alga mostrou atividade antiviral foi de $24 \mu\text{g ml}^{-1}$ na presença de luz enquanto no escuro a concentração foi superior a $250 \mu\text{g ml}^{-1}$, ou seja, praticamente não apresentou atividade antiviral. Verificou-se que é uma atividade dependente de luz indicando que os compostos responsáveis por esta atividade são fotossensíveis (75). Para além disso, no mesmo estudo foi determinado o modo de atuação destes compostos onde se verificou que estes apresentavam uma ação viricida através da destruição do vírus essencialmente ao nível da membrana (75). Num outro estudo, Matsuiro *et al.* verificaram que as galactanas sulfatadas pertencentes à família das carragenanas da alga vermelha *Schizymenia dubyi* apresentavam atividade antiviral contra o *herpes simplex* tipo I e II (76). Similarmente ao reportado no estudo anterior este composto da família das carragenanas mostrou interferir na adsorção inicial do vírus à célula. Já num estudo anterior Neushul (77) tinha verificado que as carragenanas extraídas de algas vermelhas para além de inibirem o vírus *herpes simplex* também interferem com a fusão entre células infetadas pelo vírus da SIDA.

Assim sendo, verificamos que a atividade antiviral é adquirida por um conjunto de compostos. As carragenanas e alguns compostos fotossensíveis são os compostos reportados para esta atividade, contudo estudos mais aprofundados são necessários.

2.5. Atividade antioxidante da *G. turuturu*

Devido à presença de pigmentos como a clorofila e carotenoides e vitaminas como α -tocoferol é expectável que a *G. turuturu* apresente atividade antioxidante uma vez que estes compostos são antioxidantes já conhecidos. Contudo, como referido anteriormente, ainda foram feitos poucos estudos nesta espécie de alga e, portanto, são necessárias mais evidências para comprovar esta atividade.

Num estudo Cox *et al.*(57) analisaram algumas espécies de algas vermelhas (não incluindo a *G. turuturu*) e verificaram que os seus extratos (metanólicos, etanólicos e em acetona) apresentavam atividade antioxidante através do teste de 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH). Já Liu *et al.*(78) estudaram a atividade antioxidante enzimática da *G. turuturu* e *P. palmata* e verificaram que a atividade da enzima superóxido dismutase e da peroxidase era superior na *G. turuturu*. A *Grateloupia* revelou ser a menos sensível aos diferentes *stresses*: H_2O_2 , metais pesados, salinidade e calor demonstrando que como já referido a *G. turuturu* tem facilidade para se adaptar a diferentes condições ambientais e por isso apresenta uma tolerância maior ao stress oxidativo. Numa outra espécie de *Grateloupia*, Athukorala *et al.*(79) verificaram que os extratos metanólicos da *G. filicina* apresentavam elevada capacidade sequestrante de espécies reativas de oxigénio revelando uma atividade antioxidante muito superior a alguns antioxidantes comerciais como o di-terc-butil metil fenol (BHT) e o α -tocoferol (79).

3. Objetivos

Neste sentido, o presente estudo tem como objetivos: avaliar o potencial de cultivo de *G. turuturu* num sistema experimental IMTA analisando o seu crescimento e produtividade, tendo em conta a influência do estado reprodutivo da alga; analisar a composição bioquímica da *G. turuturu* comparando a alga de cultivo com a alga recolhida nas populações selvagens da Ria de Aveiro; identificar o perfil lipídico da alga vermelha *G. turuturu* através de uma abordagem lipidómica e estudar a atividade antioxidante do extrato lipídico da *G. turuturu* selvagem e de cultivo. O cultivo da alga foi realizado na empresa ALGAplus, num sistema IMTA com condições controladas de crescimento.

Capítulo II

Cultivo em IMTA na empresa ALGAplus

A *G. turuturu* é uma alga não nativa da costa Portuguesa que se reproduz facilmente apresentando elevadas taxas de crescimento, nomeadamente em zonas ricas em nutrientes. Estas características, juntamente com o facto de ser uma espécie passível de ser explorada economicamente, tornam-na interessante para o desenvolvimento de cultivo comercial, nomeadamente em IMTA. Neste capítulo pretende-se estudar o comportamento desta alga num cultivo experimental desenvolvido na ALGAplus. Para isso, foram estudados o crescimento e a produtividade da alga sob determinadas condições. Analisou-se o comportamento da alga em duas fases distintas do seu ciclo de vida: fase reprodutiva e fase não reprodutiva. Esta espécie cresce de forma vegetativa (assexuada) mas também utilizando a via sexuada. É possível distinguir através de observação direta, fêmeas fertilizadas (com cistocarpos) e tetrasporófitos (com tetrasporócitos). Os indivíduos que não apresentam estas estruturas diferenciadas, são denominados não-férteis e apresentam normalmente taxas de crescimento superiores aos férteis (80). Sendo a fase reprodutiva crucial para a sobrevivência da espécie, a alga fica particularmente sensível ao meio ambiente respondendo de forma diferente às várias condições ambientais com alterações descritas a nível de composição química (80–82). Desta forma, durante o trabalho experimental de cultivo foi feita uma separação entre os indivíduos (lâminas) férteis – reprodutivos – e não férteis – não reprodutivos. Esta fase durou 11 semanas, durante o cultivo vários parâmetros que afetam o crescimento da alga foram monitorizados: luz (irradiância), temperatura, pH, salinidade, fluxo de nutrientes, movimentação da água e densidade de cultivo.

I. Materiais e Métodos

1.1. Sistema de cultivo

O sistema experimental de cultivo da *G. turuturu* realizou-se na empresa ALGAplus localizada em Ílhavo, Aveiro. O sistema experimental consiste em tanques de pequenas dimensões (15 a 230L) que recebem de forma contínua água rica em nutrientes proveniente de um cultivo de robalo/dourada em esteiros. O fluxo de água foi ajustado manualmente em cada tanque e as algas foram mantidas em constante movimento através de um fluxo de ar colocado no fundo de cada tanque permitindo maximizar a exposição da alga aos nutrientes da água e luz, minimizando variações de temperatura.

1.1. Parâmetros ambientais

A temperatura da água (°C), o pH e a salinidade (‰) foram monitorizados durante a experiência. As medições foram feitas entre duas a três vezes por semana em diferentes alturas do dia usando um medidor portátil (HACH LANGE HQ40d; sensores: CDC401-15, USA). A irradiância (*Photosynthetic Active Radiation, PAR*) foi também monitorizada através da medição a meio do dia (coincidente com o pico diário de irradiância), duas a três vezes por semana usando um fotómetro (model MQ-200, Apogee).

1.2. Desenho experimental do cultivo de *G. turuturu* em IMTA

A *G. turuturu* foi recolhida no Porto de pesca da Gafanha da Nazaré, Ria de Aveiro, Portugal (40°39N, 8°43W) no mês de novembro. As algas foram colhidas à mão e posteriormente lavadas com água salgada. De seguida, as algas foram separadas em dois grupos, algas em fase reprodutiva e algas em fase não reprodutiva, e colocadas em dois tanques de 15 L, respetivamente. O desenho experimental está representado na figura 9.

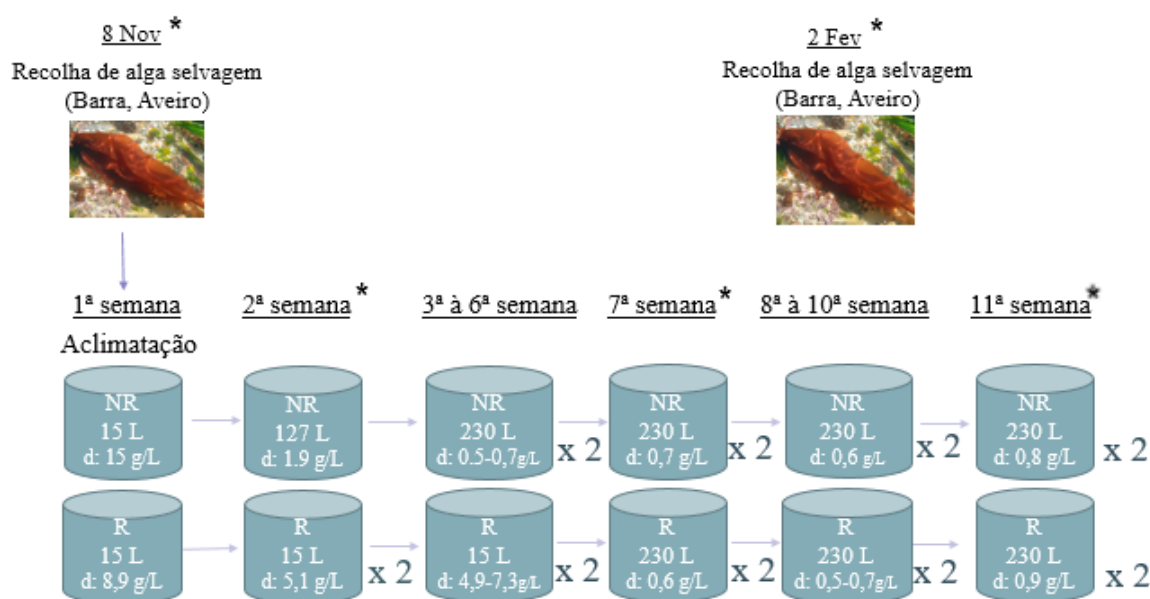


Figura 9 Esquema representativo do desenho experimental do ensaio de crescimento da *G. turuturu* recolhida do ambiente selvagem e cultivada em IMTA. A azul estão representados os tanques utilizados e respetivos volumes. R: indivíduos em fase reprodutiva; NR: indivíduos em fase não reprodutiva; d: densidade de cultivo
* semanas em que se recolheu amostra.

As algas permaneceram uma semana (aclimação) a um fluxo de 17 L h⁻¹. Após a semana de aclimação o tanque que continha as algas reprodutivas foi separado em dois tanques de 15 L com o mesmo fluxo de água (17 L h⁻¹) e as algas não reprodutivas foram transferidas para um tanque de 127 L, devido à falta de tanques de 15 L disponíveis, com um fluxo de 8 L h⁻¹. À terceira semana o grupo das algas reprodutivas permaneceu nos tanques de 15L e o grupo das algas não reprodutivas foi dividido em dois tanques de 230 L com um fluxo de água de 8 L h⁻¹. As algas permaneceram nestes tanques até há sexta semana, altura em que o grupo das algas reprodutivas foi transferido para dois tanques de 230 L onde permaneceram até ao final do experimento assim como as algas não reprodutivas. A experiência decorreu de 8 de novembro a 30 de janeiro. Os tanques foram despejados e lavados semanalmente de modo a monitorizar o crescimento e minimizar as contaminações por diatomáceas.

1.3. Cálculo dos parâmetros de crescimento

Semanalmente, a biomassa de cada tanque foi removida e limpa com água salgada. Seguidamente a biomassa foi centrifugada de modo a retirar o excesso de água e seguidamente pesada numa balança digital ($\pm 0,5$ g). Posteriormente os tanques eram repovoados com as respetivas densidades de cultivo. Nas semanas 2 e 7 uma porção de algas foi seca em estufa a 30°C durante 48h (até uma humidade máxima de 13%) e usado como amostra para o estudo de lípidos.

A taxa de crescimento relativo das algas nos tanques foi determinada pela formula:

$$TCR (\% \text{ dia}^{-1}) = \frac{\ln(pf) - \ln(pi)}{T} \times 100$$

Onde o pf= peso fresco final, pi= peso fresco inicial e T= dias em cultivo. A produtividade dos tanques foi calculada através da formula:

$$Produtividade (g \text{ dW } m^{-2} \text{ dia}^{-1}) = [(pf - pi) \times 0,12] / \text{Área} / T$$

Onde o pf= peso fresco final, pi= peso fresco inicial, dW= percentagem de peso seco, 11,8 é a percentagem de peso seco relativamente ao peso fresco (média de 19 amostras); Área= área do tanque de cultivo e T= dias em cultivo.

II. Resultados e Discussão

A *G. turuturu* é uma alga que apresenta uma grande capacidade de adaptação a diferentes condições ambientais e consegue reproduzir-se durante todo o ano, desta forma é uma boa candidata para o cultivo em aquacultura. Neste trabalho as algas foram cultivadas num período de 2 meses, tendo iniciado no dia 8 de novembro e terminado no dia 31 de dezembro. Este período corresponde com a fase lenta de crescimento descrita para a *G. turuturu* que ocorre durante o inverno (8). Perante a escassez de biomassa no ambiente selvagem a experiência foi adaptada. Esta adaptação passou pela diminuição das densidades de cultivo dos tanques, conforme a quantidade de biomassa possível de recolher e os tanques disponíveis para o cultivo. Durante a experiência foi registado o crescimento da alga e as condições ambientais, nomeadamente a temperatura, a luminosidade, o pH e a salinidade.

2.1. Parâmetros ambientais

A variação da temperatura da água (°C) e da luminosidade (irradiância) registadas ao longo das semanas de cultivo estão representadas na figura 6. Estas variações refletem as flutuações espectáveis para a época do ano em que foi realizado o cultivo (novembro - janeiro). Em média a temperatura da água oscilou entre $9,2 \pm 1,1$ °C e $15,8 \pm 0,5$ °C, não havendo diferenças significativas entre os tanques de cultivo. Quanto à irradiância, os valores oscilaram em média entre 58 ± 3 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ e 895 ± 95 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ sem diferenças significativas entre os tanques de cultivo (Figura 10). Os valores de pH e salinidade da água foram mais constantes sendo que a média correspondeu a $8,09 \pm 0,02$ e $34,8 \pm 0,1$ ‰, respetivamente.

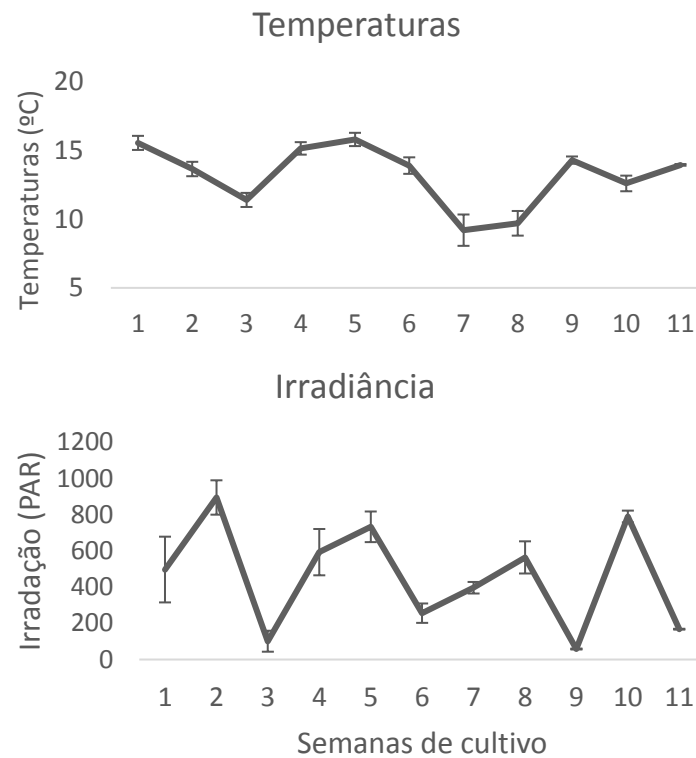


Figura 10 Irradiância (abaixo) e Temperatura (acima) registradas ao longo das sete semanas de cultivo de *G. turuturu* (médias \pm erro padrão).

Durante a experiência os parâmetros ambientais que mais variaram foram a temperatura da água e a irradiância. Observa-se que as temperaturas mais baixas foram registradas nas semanas 3, 7 e 8 e as menores luminosidades nas semanas 3, 6, 9 e 11. Assim, verifica-se que a semana 3 foi a que apresentou simultaneamente baixa luminosidade e temperatura. Tendo em especial atenção para as semanas em que foram recolhidas amostras observa-se que à semana 2 foram registradas temperaturas amenas (considerando a estação do ano em que foram registradas) e elevada luminosidade. Na sétima semana foram registradas temperaturas baixas e uma luminosidade ligeiramente baixa. Na semana 11 registaram-se temperaturas elevadas e luminosidade baixa.

2.2. Ensaio de crescimento da *G. turuturu* na fase reprodutiva do ciclo de vida

Verificou-se que os indivíduos reprodutivos de *G. turuturu* foram capazes de crescer no sistema experimental IMTA durante todo o ensaio sob as condições de cultivo utilizadas (Figura 11).

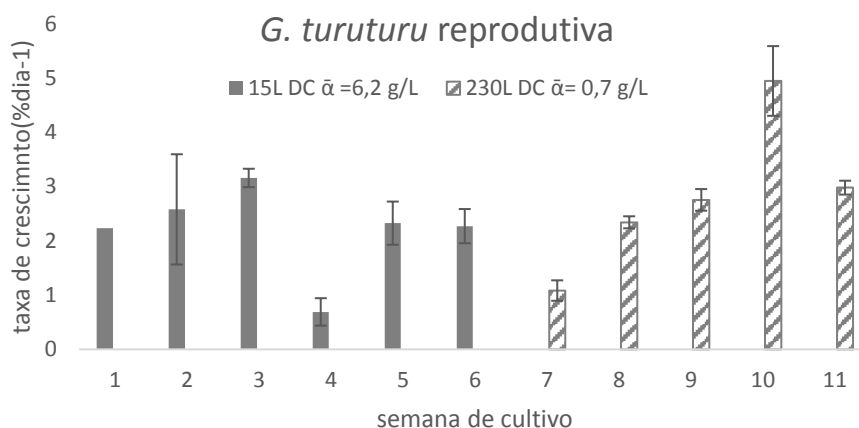


Figura 11 Taxa de crescimento relativo (média \pm erro padrão) da *G. turuturu* em fase reprodutiva cultivada em IMTA durante 7 semanas. 15L e 230L corresponde ao volume dos tanques utilizados para cultivo. DC α : média de densidade de cultivo.

Após a semana de aclimação às condições de cultivo no sistema experimental da ALGAplus os indivíduos em fase reprodutiva foram transferidos e separados em dois tanques na semana 2, alterando a densidade de cultivo de 8,9 g/L para 5,1 g/L. Esta diminuição de densidade aliada à temperatura e luminosidade registadas nessas semanas levaram ao aumento da taxa de crescimento, uma vez que em ambientes aglomerados a luz torna-se um fator limitante para o crescimento da alga (83). Contudo, na 4ª semana a taxa de crescimento diminuiu drasticamente muito provavelmente devido à baixa temperatura e luminosidade registadas na semana anterior. Esta observação vai de encontro ao descrito na literatura por Lobban e Harrison, estes autores referem que a luz e a temperatura são os parâmetros que mais afetam o crescimento e a incorporação de nutrientes pelas macroalgas (80). Nas duas semanas seguintes observa-se um aumento da taxa de crescimento já que se verificou o aumento da temperatura e luminosidade nessas semanas. Na sétima semana há uma nova diminuição da taxa de crescimento provavelmente devido a uma diminuição na densidade de cultivo e das temperaturas e luminosidade registadas nessas semanas. Durante o cultivo verificou-se ainda que a alga reprodutiva originou cerca de 2 - 4 % de indivíduos não férteis que foram transferidos para os tanques correspondentes durante a experiência.

A produtividade ao longo do cultivo de indivíduos reprodutivos de *G. turuturu* está representada na Figura 12. Observa-se que a tendência é semelhante à determinada para a taxa de crescimento uma vez que a produtividade do cultivo está dependente do crescimento da alga. Desta

forma verificou-se que as semanas mais produtivas foram as semanas 1 e 6 e as menos produtivas as semanas 4 e 7.

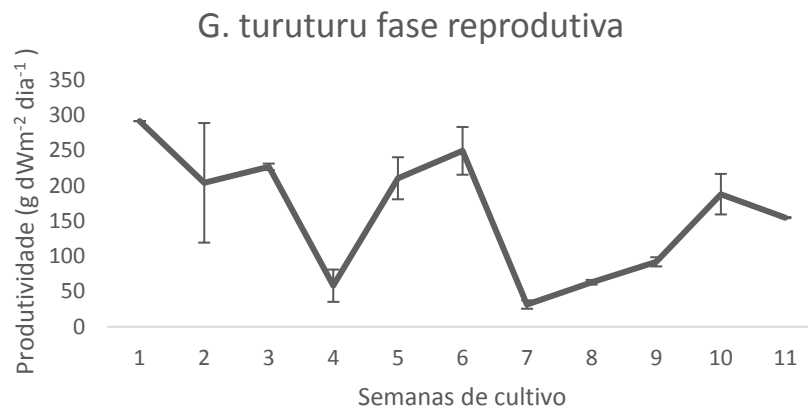


Figura 12 Produtividade (média \pm erro padrão) da *G. turuturu* em fase reprodutiva cultivada em IMTA durante 7 semanas.

De um modo geral, nas primeiras 6 semanas a partir de 133g iniciais de indivíduos em fase reprodutiva foi possível produzir 308,5g de *G. turuturu* num espaço de 44 dias em 0,13 m². A partir da sétima semana partindo de 268g iniciais foi possível produzir 678,5g de *G. turuturu* em 39 dias em 0,56 m². Assim sendo verificamos um aumento de biomassa de 243% no cultivo em tanques de (15L) durante 44 dias (primeiras 6 semanas) e um aumento da biomassa em 253 % no cultivo em tanques (230L) durante 39 dias (da 7ª à 11ª semana).

2.3. Ensaio de crescimento da *G. turuturu* na fase não reprodutiva do ciclo de vida

Verificou-se que a *G. turuturu* em fase não reprodutiva foi capaz de crescer em IMTA durante todo o ensaio sob as condições de cultivo utilizadas (Figura 13).

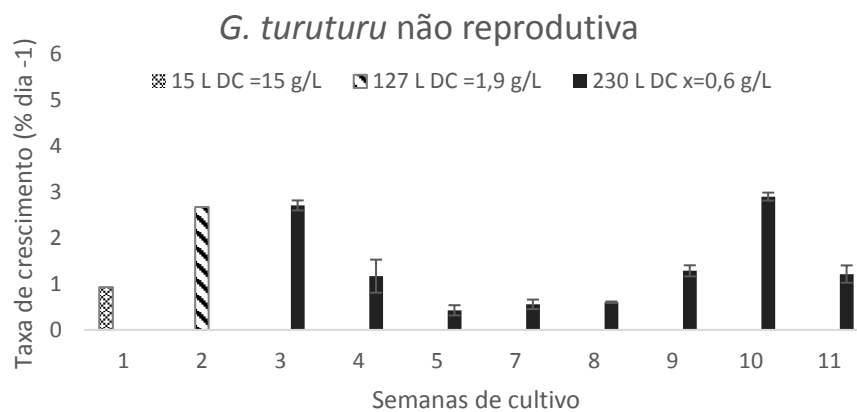


Figura 13 Taxa de crescimento relativo (média \pm erro padrão) da *G. turuturu* em fase não reprodutiva cultivada em IMTA durante 7 semanas. 15L, 127 e 230L corresponde ao volume dos tanques utilizados para cultivo. DC \bar{x} : média de densidade de cultivo.

Após a semana de aclimação às condições de cultivo no sistema experimental da ALGAplus, e por limites logísticos a alga foi mantida uma semana extra num tanque de 127 L. A partir da 3ª semana estabeleceram-se 2 réplicas. Estas transferências modificaram (diminuíram) a densidade de cultivo a que a alga se encontrava. Durante a 1ª semana a alga esteve a uma densidade muito alta apresentando uma taxa de crescimento baixa, uma vez que em ambientes aglomerados a luz torna-se um fator limitante para o crescimento da alga (83). Neste sentido, após a alteração da densidade de cultivo na 2ª semana alga aumentou a sua taxa de crescimento, efeito que também pode ter sido potenciado pela temperatura e luminosidade elevada registadas nessas semanas. A alteração da densidade de cultivo da segunda para a terceira semana não repercutiu efeito na taxa de crescimento da alga. No entanto, na quarta semana houve uma diminuição acentuada da taxa de crescimento tal como se registou na alga em fase reprodutiva, evidenciando que esta alteração provavelmente ocorreu devido à baixa temperatura e luminosidade registadas na semana anterior. Contudo após as temperaturas e luminosidade aumentarem nas semanas seguintes a taxa de crescimento permaneceu diminuída. Esta diminuição pode sugerir que a alga em fase reprodutiva tem uma melhor capacidade de adaptação às condições ambientais que a alga em fase não reprodutiva. Um estudo de Hanelt *et al.* (84) reporta uma situação similar na espécie *Laminaria saccharina* em que as algas em fase reprodutiva tinham uma recuperação mais rápida a um stress de luz do que as algas não reprodutivas. Durante o cultivo verificou-se ainda que a alga não reprodutiva originou cerca de 5 - 7 % de indivíduos reprodutivos que foram transferidos para os tanques correspondentes durante a experiência. De salientar também que à sétima semana algumas algas não reprodutivas começaram a apresentar manchas, um sinal de deterioração (Figura 14) e a partir da 9ª semana houve uma contaminação por diatomáceas nos tanques da alga em fase não reprodutiva inviabilizando essas amostras para as análises posteriores.

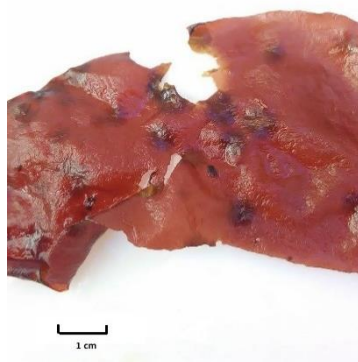


Figura 14 Aparência de alguns indivíduos de *G. turuturu* em fase não reprodutiva após 7 semanas de cultivo em IMTA.

A produtividade do cultivo para a *G. turuturu* não reprodutiva está representada na Figura 15. Verifica-se que a tendência é semelhante à taxa de crescimento relativa uma vez que em ambas é tido em conta o crescimento da alga. Observou-se que a maior produtividade se registou na 1ª e 2ª semana e a menor entre a 5ª e a 7ª semana.

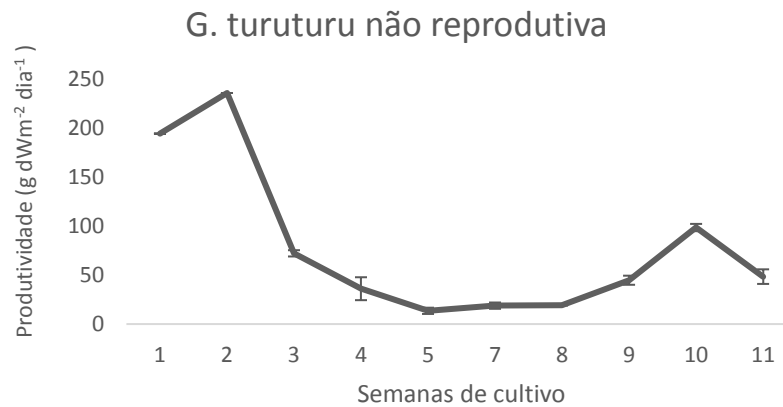


Figura 15 Produtividade (média ± erro padrão) da *G. turuturu* em fase reprodutiva cultivada em IMTA durante 7 semanas

De um modo geral, na 1ª semana a partir de 223 g foi possível produzir 238 g de *G. turuturu* em 0,13 m² em 7 dias. Na 2ª semana a partir de 238g foi possível produzir 287g em 0,35 m² durante 7 dias. Desde a 3ª semana até ao final da experiencia foi possível produzir 498g a partir de 300g iniciais de *G. turuturu* em 0,56 m² durante 69 dias. Então verificamos que houve um crescimento de 107% durante a 1ª semana, na segunda semana houve um crescimento de 121% e da 3ª-11ª semana houve um crescimento de 166%.

Em suma, verificou-se que em ambas as fases do ciclo de vida a temperatura e a luz desempenharam um papel importante no desempenho da *G. turuturu* influenciando o seu crescimento e consequentemente a produtividade do cultivo. Para além disso, em ambas as fases a alga conseguiu crescer mesmo estando no período de crescimento lento descrito por Araújo *et al.* (8). Esta capacidade é uma das vantagens do cultivo em IMTA desta alga uma vez que no mesmo período a *G. turuturu* em ambiente selvagem não estava a crescer havendo um número muito reduzido de indivíduos no local de recolha. Porém a partir da 7ª semana começou-se a observar alguma deterioração da alga sendo que à 9ª semana houve uma contaminação por diatomáceas nos tanques da alga em fase não reprodutiva inviabilizando a utilização dessas amostras nas análises posteriores. A partir destas observações podemos verificar que um cultivo superior a 7 semanas não é aconselhado para a *G. turuturu* durante esta altura do ano. Desta forma as análises que se seguem foram realizadas até à 7ª semana de cultivo.

Capítulo III

Estudo da composição Bioquímica da *G. turuturu*
e suas variações com o cultivo em IMTA

O estudo da composição das algas é de extrema importância uma vez que permite obter informação acerca do seu valor nutricional. Como demonstrado no capítulo I, a composição da alga pode variar consoante a localização e as condições ambientais. Na literatura já existem alguns estudos referentes à composição bioquímica da *G. turuturu*, contudo são todos referentes à alga em ambiente selvagem. Desta forma, existe uma carência de informação quanto à composição bioquímica desta alga em aquacultura. O cultivo em IMTA permite controlar alguns parâmetros, como o fluxo de nutrientes e a densidade de cultivo, minimizando a variabilidade biótica e abiótica responsável pelas diferenças na composição química das algas encontradas em ambiente selvagem. Neste sentido, neste capítulo serão apresentados os resultados obtidos no estudo da composição bioquímica da alga *G. turuturu* cultivada em IMTA e a sua variação ao longo do cultivo. Além disso irá também ser comparada a composição bioquímica da *G. turuturu*, recolhida no Porto de Aveiro em períodos homólogos. Ademais, será tido em conta a fase do ciclo de vida em que a alga se encontra uma vez que, como demonstrado no capítulo anterior, há diferenças de comportamento relativamente ao meio ambiente. Desta forma, foi analisado o teor de cinzas, proteína, lípidos e fibra dietética da alga nas diferentes condições mencionadas.

I. Materiais e Métodos

1.1. Amostragem

Em diferentes alturas foram recolhidas porções de alga fresca tanto de cultivo como selvagem (reprodutiva e não reprodutiva), como descrito no capítulo II. As algas frescas foram secas numa estufa a 30°C durante 48h de modo a que a percentagem de humidade não excedesse os 13%. As amostras secas foram as seguintes: *G. turuturu* selvagem recolhida no dia 8 de novembro na Ria de Aveiro, Portugal (40°39N, 8°43W), *G. turuturu* após 2 semanas de cultivo em IMTA (22 de novembro) onde foi recolhida uma porção de cada tanque, *G. turuturu* após 7 semanas de cultivo em IMTA (27 de dezembro) onde foi recolhida uma porção de cada tanque e *G. turuturu* selvagem recolhida no dia 2 de fevereiro na Ria de Aveiro, Portugal (40°39N, 8°43W). Após a secagem as algas foram moídas até obter flocos de aproximadamente 1mm. Cada porção de amostra foi embalada em pequenos sacos de plástico devidamente selados e guardados para análises posteriores.

1.2. Teor de Cinzas

O conteúdo de cinzas totais foi determinado de acordo com o método AOAC, (1990) (85). Para tal foram incineradas 100mg de cada amostra de alga seca a 575°C durante aproximadamente 6 horas. As amostras foram incineradas numa mufla *Select Horn* (JP Selecta, Espanha), após a inceneração

as amostras foram colocadas num exsiccador até arrefecerem e posteriormente pesadas. O procedimento foi feito em duplicado para cada amostra.

1.3. Proteína total

O conteúdo de azoto (N) foi quantificado através de análise elementar com um analisador TruSpec 630-200-200 realizado no Laboratório de Microanálise no Departamento de Química da Universidade de Aveiro. Para a análise utilizou-se 2 mg de biomassa seca, que foi sujeita a uma temperatura de combustão de 1075 °C e uma temperatura pós-combustão de 850 °C. O azoto foi determinado por condutividade térmica. A quantidade de proteínas é estimada através da multiplicação de um fator padrão de 6.25 (86).

1.4. Extração de lípidos

Os lípidos totais foram extraídos com uma mistura de clorofórmio/metanol (1:2, v/v). Para a extração de lípidos foram adicionados 3,75 mL da mistura de solventes a 250 mg de alga seca colocados em tubos de ensaio com tampas de Teflon. A mistura foi sujeita a agitação no vortex durante 2 min e colocados num banho de ultra-sons durante 1 min. Posteriormente os tubos foram incubados em gelo num agitador orbital durante 2 h e 30 min. A mistura foi centrifugada a 2000 rpm durante 15 min e a fase orgânica foi recolhida. Foram feitas duas novas extrações do resíduo de biomassa com 3 mL da mistura de solventes. À fase orgânica total recolhida foi adicionado 2,3 mL de água Mili-Q (Synergy, Millipore Corporation, Billerica, MA, USA) para induzir a separação de fases. Seguidamente os tubos foram centrifugados a 2000 rpm durante 15 min e a fase orgânica (inferior) transferida para um novo tubo. Os extratos lipídicos foram secos sob uma corrente de azoto e pesados. Desta forma, o teor de lípidos totais foi determinado por método gravimétrico e calculado como percentagem (%) de peso seco. Foram realizadas duas réplicas biológicas e uma vez que as extrações e as análises foram realizadas em dias diferentes os extratos lipídicos foram armazenados a -20 °C para as futuras análises em GC-MS e LC-MS.

1.5. Fibra dietética total

O teor de fibra dietética total foi determinado por cálculo: ao valor de massa de alga seca foram subtraídos o teor de cinzas, de proteína e de lípidos de modo a obter o teor de fibra total.

II. Resultados e Discussão

2.1. Composição bioquímica da alga em fase reprodutiva

A composição bioquímica da *G. turuturu* em fase reprodutiva ao longo do ensaio está representado na tabela 4. Como referido foram determinados o teor de humidade, cinza, proteína, lípidos e fibra. Para as algas selvagens, durante a experiência, o peso seco variou entre 11,4 – 17,7 % peso fresco sendo que o teor de proteína total oscilou entre 19,75 – 20,47 % peso seco, o teor de lípidos totais variou entre 0,22 – 0,26 % peso seco, a percentagem de cinzas variou entre 24,40 – 28,68 % peso seco e o teor de fibras calculado encontra-se entre 52,12 e 55,35 % peso seco. Para as algas de cultivo, durante a experiência, o peso seco variou entre 10,7 – 13,2 % peso fresco sendo que o teor de proteína total oscilou entre 19,56 – 22,20 % peso seco, o teor de lípidos totais variou entre 0,23 – 0,41 % peso seco, a percentagem de cinzas variou entre 19,74 – 27,05 % peso seco e o teor de fibras calculado encontra-se entre 53,93 e 57,59 % peso seco.

Tabela 4 Composição Bioquímica da *G. turuturu* em estado reprodutivo selvagem e de cultivo em IMTA (2 e 7 semanas) (média ± erro padrão)

Parâmetros (g/100g alga seca)	<i>G. turuturu</i> reprodutiva			
	2 semanas cultivo	7 semanas cultivo	Selvagem inicial	Selvagem final
% Proteína total	19,56 ± 0,15 ^a	22,20 ± 0,01 ^b	20,47 ± 0,003 ^a	19,75 ± 0,06 ^a
% Lípido total	0,23 ± 0,01 ^a	0,41 ± 0,01 ^b	0,22 ± 0,00 ^a	0,26 ± 0,01 ^a
% Fibra	53,93	57,69	52,12	55,35
% Cinzas	27,05 ± 0,00 ^a	19,74 ± 0,00 ^b	28,68 ± 0,02 ^a	24,40 ± 0,00 ^c

% Fibra= 100 - %proteína- %lípidos - % cinzas; letras a-c representam diferenças significativas ($p < 0.05$) em cada linha

Através dos dados da tabela verificamos que a composição da alga selvagem em fase reprodutiva se mantém ao longo do tempo, exceto para as cinzas onde se verifica uma diminuição ao longo do tempo. Contrariamente, durante o cultivo a composição varia bastante ao longo do tempo. O peso seco presente na *G. turuturu* encontra-se próximo do intervalo reportado na literatura (6,5 – 12 %), excepto para a selvagem final onde se verifica uma percentagem de humidade de 17,7 % peso seco. Analisando a tabela verifica-se que o teor de proteína total determinado está de acordo com o descrito na literatura em que os estudos efetuados em *G. turuturu* selvagem reportam um teor de proteína de 16-27% peso seco dependendo da altura do ano (15,16,19–21). Nos nossos resultados observa-se que o teor de proteína varia entre 19,75 - 20,47 % peso seco para a alga selvagem e entre 19,56 – 22,20 % peso seco para a alga de cultivo. No entanto foi possível observar uma variação significativa à 7ª semana de cultivo. Verifica-se que ao longo do cultivo (da semana 2 para a semana 7) há um aumento significativo do teor de proteína, de 19,56 % para 22,2 %. Para além disso, quando comparado o teor de proteína da 7ª semana com a alga selvagem de um período homólogo observa-se que este também se encontra aumentado na alga após 7 semanas de cultivo. A alga às 2 semanas de cultivo não

apresenta um teor de proteínas significativamente diferente da alga selvagem correspondente. Este aumento do teor de proteína à 7ª semana de cultivo vai de encontro ao que seria expectado uma vez que a água presente nos tanques de cultivo é proveniente de aquacultura de robalo/dourada e é bastante rica em azoto. Neste sentido, a alga atua como biofiltro incorporando o azoto na forma de amónia para biossíntese de proteínas.

Quanto ao teor de lípidos totais observa-se uma variação entre 0,22 – 0,26 %_{peso seco} para a alga selvagem e entre 0,23 – 0,41 %_{peso seco} para a alga de cultivo. Estes valores estão abaixo dos 0,7 - 3,6%_{peso seco} reportados pela literatura para a *G. turuturu* selvagem (15–17,19,20,22). Esta diferença pode estar associada ao local de colheita da alga uma vez que Munier *et al.* demonstrou que em diferentes locais de colheita a *G. turuturu* pode apresentar composições diferentes (15). Uma outra explicação para esta diferença pode ser o método de extração utilizado já que este foi otimizado para a extração de lípidos polares. O teor de lípidos totais apresenta uma diferença significativa à 7ª semana de cultivo. Desta forma, o teor de lípidos aumenta durante o cultivo sendo que da 2ª para a 7ª semana passa de 0,23% para 0,41% o teor de lípidos totais. Os valores também se encontram aumentados quando comparando a 7ª semana de cultivo com a alga selvagem do mesmo período. Este aumento pode ser explicado pela abundância de fósforo nas águas provenientes da aquacultura levando à biossíntese de fosfolípidos e desta forma aumentando o teor e lípidos totais.

A percentagem de cinzas está acima do expectado uma vez que os dados da literatura mostram que a *G. turuturu* selvagem pode apresentar cinzas entre 7 - 20 %_{peso seco} (15,16,19,20). O estudo de Rodrigues *et al.* (20) é o que reporta percentagens de cinzas mais próximas ($20,52 \pm 0,01\%$) das percentagens demonstradas no presente estudo. Curiosamente, esse estudo é o único, de entre os acima citados, que estuda a composição da *G. turuturu* selvagem da costa Portuguesa (Figueira da Foz) podendo então indicar uma característica desta alga na costa Portuguesa. Por outro lado, os estudos sazonais reportam um aumento da percentagem de cinzas no inverno e tendo em conta que este estudo foi realizado nessa estação os valores podem estar aumentados por uma questão sazonal (16,30). Uma vez que a quantidade de cinzas está associada à quantidade de minerais presentes na alga, observamos que a *G. turuturu* é uma boa fonte de minerais. Os valores são similares ao espinafre (20.4 %) uma das plantas terrestres com mais minerais (87). Observa-se que às 7 semanas de cultivo em IMTA o teor de cinzas diminui significativamente quando comparado com a alga às 2 semanas de cultivo. Contudo quando comparado as 7 semanas com a alga selvagem do período homólogo verifica-se que há também uma diminuição significativa, porém a diferença é menor do que às 2 semanas de cultivo. Isto sugere que houve alterações, provavelmente sazonais, que afetaram a quantidade de minerais tanto no cultivo como em ambiente selvagem, porém estas diferenças foram mais sentidas em cultivo.

O teor de fibra dietética calculado encontra-se dentro do esperado. Na literatura são reportados teores em fibra dietética na gama dos 41 – 60 %_{peso seco}. Tal como nos grupos de compostos anteriores a maior diferença observa-se às 7 semanas de cultivo com um aumento da percentagem de fibra dietética da 2ª semana de cultivo para a 7ª semana de cultivo.

2.2. Composição Bioquímica da alga em fase não reprodutiva

A composição bioquímica da *G. turuturu* em fase não reprodutiva ao longo do ensaio está representado na tabela 5. Como referido, foram determinados o teor de humidade, cinza, proteína, lípidos e fibra. Para as algas selvagens, verificou-se que o peso seco variou entre 6,84 -16,78 %_{peso fresco}, o teor em proteína total registou valores entre 21,33 – 21,83 %_{peso seco}, o teor em lípido total oscilou entre 0,42 – 0,50 %_{peso seco}, a percentagem de fibra dietética encontra-se entre 48,74 – 51,26 %_{peso seco} e a percentagem de cinzas varia entre 26,49 – 29,43%_{peso seco}. Para as algas de cultivo verificou-se que o teor de humidade variou entre 9,28 - 13,12 %_{peso seco}, o teor em proteína total registou valores entre 10,83 – 24,40 %_{peso seco}, o teor em lípido total oscilou entre 0,22 – 0,46 %_{peso seco}, a percentagem de fibra dietética encontra-se entre 54,55 – 58,30 %_{peso seco} e a percentagem de cinzas varia entre 20,2 – 29,46%_{peso seco}.

O peso seco da *G. turuturu* em fase não reprodutiva variou entre 4,56 e 16,78% _{peso fresco}. Estes valores encontram-se próximos dos valores reportados na literatura que mostram valores entre 6,5 – 12% _{peso fresco} (15,19,20). No entanto, a percentagem de humidade de uma das amostras está um pouco acima desse intervalo.

Tabela 5 Composição Bioquímica da *G. turuturu* em estado não reprodutivo selvagem e de cultivo em IMTA (2 e 7 semanas) (média ± erro padrão)

Parâmetros (g/100g alga seca)	<i>G. turuturu</i> Não Reprodutiva			
	2 semanas cultivo	7 semanas cultivo	Selvagem inicial	Selvagem final
% Proteína total	10,83 ± 0,02 ^b	24,40 ± 0,01 ^a	21,33 ± 0,01 ^a	21,83 ± 0,05 ^a
% Lípido total	0,46 ± 0,10 ^a	0,22 ± 0,02 ^b	0,50 ± 0,10 ^a	0,42 ± 0,03 ^a
% Fibra	58,30	54,55	48,74	51,26
% Cinzas	29,46 ± 0,00 ^a	20,23 ± 0,01 ^b	29,43 ± 0,00 ^a	26,49 ± 0,00 ^c

% Fibra= 100 - %proteína- %lípidos - % cinzas; letras a-c representam diferenças significativas ($p < 0.05$) em cada linha

Através da análise dos dados da tabela observa-se que a composição da *G. turuturu* selvagem se manteve ao longo do tempo, exceto na percentagem de cinzas onde se verifica uma diminuição ao longo do tempo. Por outro lado, as composições das algas de cultivo variaram significativamente durante o cultivo.

Analisando mais detalhadamente a tabela 5 observa-se que os valores de proteína total da *G. turuturu* em fase não reprodutiva variou entre 10,8-24,4%_{peso seco}. Os valores determinados neste

estudo vão de encontro aos valores descritos na literatura que reportam teores de proteína entre 16 - 27%_{peso seco} para a *G. turuturu* selvagem (15,16,19–21). Os dados da tabela mostram que houve uma diferença significativa às 2 semanas. Observa-se que há uma diminuição quando comparamos o teor de proteínas da 2ª semana com a selvagem correspondente (inicial), contudo durante o cultivo (da 2ª para a 7ª semana) o teor proteico à 7ª semana mais que duplica. No entanto quando comparamos os valores de proteína da selvagem inicial e final verificamos que não há diferenças significativas. Entre a alga de cultivo após 7 semanas e a alga selvagem correspondente (final) onde não se verificam diferenças significativas. Esta oscilação pode representar um período de adaptação inicial às condições do cultivo.

O teor de lípidos totais determinado encontra-se entre 0,22 – 0,50 %_{peso seco}. Estes valores encontram-se abaixo dos 0,7 - 3,6%_{peso seco} reportados na literatura (15–17,19,20,22). Esta diferença pode estar associada ao local de colheita da alga uma vez que Munier *et al.* demonstrou que em diferentes locais de colheita, a *G. turuturu* pode apresentar composições diferentes (15). Uma outra explicação para esta diferença pode ser o método de extração utilizado já que este foi otimizado para a extração de lípidos polares. Quanto à variação ao longo do tempo observa-se que o teor de lípidos totais é significativamente diferente à 7ª semana. Durante o cultivo há uma diminuição do teor de lípidos da 2ª semana para a 7ª semana passando de 0,46 para 0,22, respetivamente. Comparando os valores do teor lipídico entre a 7ª semana de cultivo e a selvagem correspondente (final) verifica-se que no cultivo os valores estão mais baixos. Esta diminuição pode ser explicada dado que em cultivo há abundância de nutrientes na água e desta forma a alga não entra em *stress* e, portanto, biossintetiza menos lípidos.

A percentagem de cinzas está um pouco acima do esperado uma vez que apresenta valores entre 20,2 – 29,4%_{peso seco}, e segundo os dados da literatura a *G. turuturu* apresenta teores de cinzas entre os 7 - 20 %_{peso seco} em ambiente selvagem(15,16,19,20). Tal como na alga em fase reprodutiva verificamos que estes valores estão mais próximos dos reportados por Rodrigues *et al.* (20), sendo este o único estudo também feito na costa portuguesa. Por outro lado os estudos sazonais reportam um aumento de cinzas no inverno e tendo em conta que este estudo foi realizado nessa estação os valores podem estar aumentados por uma questão sazonal (16,33). A 2ª semana de cultivo e a alga selvagem correspondente não apresentam diferenças significativas no teor em cinzas. Contudo da 2ª para a 7ª semana verifica-se uma diminuição significativa passando de 29,4% para 20,2%_{peso seco}, respetivamente. No entanto a *G. turuturu* selvagem final também apresenta uma diminuição significativa quando comparada com a selvagem inicial, porém é uma diminuição menos significativa uma vez que de 29,4% passa para 26,5%_{peso seco}. Isto sugere que o teor de cinzas tem uma tendência a baixar em dezembro – janeiro, contudo em IMTA essa variação é mais sentida.

O teor de fibra dietética calculado esteve entre os 48,7 - 58,3 %_{peso seco}. Estes valores encontram-se dentro do esperado uma vez que na literatura são reportados teores em fibra dietética na gama dos 41 – 60 %_{peso seco} para a *G. turuturu* selvagem. Verifica-se que com o cultivo as algas aumentam o teor de fibra uma vez que para a 2^a e 7^a semana são calculados valores de 58,3%_{peso seco} e 54,6%_{peso seco}, respetivamente e para as selvagens os valores calculados foram 48,7%_{peso seco} e 51,3%_{peso seco}, para a selvagem inicial e final, respetivamente.

De um modo geral, verificamos que as duas fases apresentaram composições bioquímicas diferentes perante o cultivo, contudo estas diferenças podem ser reflexo das diferentes densidades de cultivo utilizadas. Porém segundo a literatura sabe-se que há diferentes composições consoante a fase do ciclo de vida (80–82).

Capítulo IV

Análise Lipidômica

Neste capítulo foi estudado o perfil de AG de *G. turuturu* durante o cultivo experimental em IMTA tendo em conta a fase do seu ciclo de vida usando cromatografia de fase gasosa acoplada a um espectrómetro de massa (GC-MS). Esta análise permitiu identificar os AG presentes na *G. turuturu* consoante a sua abundância permitindo avaliar o valor nutritivo da alga em termos de AG, nomeadamente os *n*-3. Para além disso, foi identificado o perfil detalhado de lípidos polares da *G. turuturu* após 7 semanas de cultivo experimental em IMTA usando uma abordagem lipidómica utilizando cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massa (HILIC-LC-*Q*-*exactive*-MS). Esta análise permitiu identificar as classes de lípidos polares presentes na *G. turuturu* assim como as espécies moleculares de cada classe. A análise do espectro MS/MS permitiu a confirmação da estrutura das espécies moleculares de cada classe de lípidos incluindo a estrutura da cabeça polar e os ácidos gordos substituintes.

I. Materiais e Métodos

1.1. Análise e quantificação de ácidos gordos por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massa (GC-MS)

A análise dos ácidos gordos presentes no extrato lipídico da alga *G. turuturu* foi realizada através de GC-MS. Previamente à análise por GC-MS, os AG foram derivatizados de modo a ficarem mais voláteis. Para tal fez-se transmetilação de ácidos gordos uma vez que os ácidos gordos metilados resultantes são mais voláteis. O processo de transmetilação seguiu as linhas gerais da metodologia proposta por Aued-Pimentel *et al.* (88). O método baseia-se na adição de hidróxido de potássio em metanol com o objetivo de formar ésteres metílicos de ácidos gordos. Desta forma, transferiu-se 30 µg do extrato lipídico redissolvido em CHCl₃, para um tubo previamente lavado com *n*-hexano. Foram feitas análises em duplicado para cada amostra. O clorofórmio foi evaporado através de uma corrente de azoto. Seguidamente adicionou-se 1 mL de padrão interno C17:0 (0,42 µg/mL) em hexano a cada tubo e de 200 µL de hidróxido de potássio (2 M) em metanol. Os tubos foram agitados num vortex durante 2 min aos quais se adicionaram 2 mL de solução cloreto de sódio (10g/L). De forma a separar as duas fases, os tubos foram centrifugados durante 5 min a 2000 rpm. Recolheu-se a fase orgânica para um *eppendorf*, previamente lavado com hexano havendo o cuidado de não retirar mais de 800 µL da fase orgânica, de modo a não recolher sais. Seguidamente, a fase orgânica foi seca numa corrente de azoto. Para a análise por GC-MS, as amostras foram dissolvidas em 50 µL de *n*-hexano. Amostras de 2 µL dessa solução foram injetados num cromatógrafo gasoso (Agilent Technologies 6890N Network, Santa Clara, CA, EUA) equipado com uma coluna capilar DB-FFAP de 30m de comprimento, 0,32 mm de diâmetro, e 0,25µm de espessura (J&W Scientific, Folsom,

CA, EUA). O cromatógrafo gasoso encontrava-se um espectrómetro de massa (Agilent 5973 Network Mass Selective Detector) equipado com uma fonte de impacto eletrónico a qual operava a 70 eV e à temperatura de 250 °C. Os espectros de massa foram adquiridos em modo *full scan* na gama m/z 40-550 em ciclos de 1 s. A injeção das amostras decorreu em modo *spitless*, com um tempo de *spitless* de 4,4 min com o injetor a 220°C e o detetor a 250 °C. O programa de temperaturas utilizado corresponde ao seguinte: uma temperatura inicial de 80 °C durante 3 min, com um aumento linear até aos 160 °C a 25 °C/min, seguindo um novo aumento linear de 2 °C/min até aos 210 °C e depois a 30°C/min até aos 250 °C, permanecendo nos 250°C durante 10 min. O gás hélio utilizado para o transporte da amostra apresentou um fluxo de 1,4 mL/min, e a coluna estava a uma pressão de 2,66 psi. A identificação dos ácidos gordos de cada amostra foi feita por comparação do tempo de retenção e dos espectros de massa com padrões comerciais de ácidos gordos metilesterificados (Supelco 37 Component FAME Mix) e pela confirmação através de comparação com os espectros de massa das bibliotecas “The AOCS Lipid Library” e “Wiley 275”. A massa de cada ácido gordo, em µg, por g de alga seca foi determinada através da reta de calibração obtida para cada ácido gordo usando a mistura de padrões comerciais de ácidos gordos metilesterificados.

1.2. Análise de lípidos polares por cromatografia líquida de alta eficiência acoplada à espectrometria de massa (HILIC-LC-*Q*-*exactive*-MS)

De modo a identificar o lipidoma da *G. turuturu* em fase não reprodutiva recorreu-se à técnica de HPLC-MS. Os lípidos polares do extrato lipídico foram separados através da cromatografia líquida de interação hidrofílica (HILIC-LC/MS) utilizando um sistema de HPLC *Thermo Accela* com injetor automático acoplado *online* ao espectrómetro de massa *Q Exactive Orbitrap* (Thermo, Alemanha). Aliquotas de 5 µL de amostra (correspondente a 5 µg de extrato lipídico) e 95 µL de eluente B foram introduzidos numa coluna *Ascentis Si HPLC Pore* (15 cm por 1,0 mm, 3 µm; Sigma-Aldrick), com um caudal de 40 µL/min mantida a 30 °C. O sistema de solventes era composto por duas fases móveis: o eluente A [acetonitrilo: metanol: água 50:25:25 (v/v/v) com 1 mM de acetato de amónia] e o eluente B [acetonitrilo: metanol 60:40 (v/v) com 1 mM de acetato de amónia]. O gradiente de solvente utilizado foi o programado da seguinte forma: 0% de eluente A durante 8 min; seguindo-se um aumento linear para 60 % de eluente A durante 7 min, no qual se manteve durante 15 min, retornando às condições iniciais em 10 min. O espectrómetro de massa do tipo *Q exactive orbitrap* operou simultaneamente em modo positivo (*electrospray*, voltagem: 3.0 kV) e modo negativo (*electrospray*, voltagem: -2.7 kV). A taxa de fluxo de gás foi mantida a 15 unidades, a temperatura do capilar foi de 250 °C, o potencial das S-lentes RF foi igual a 50 unidades e a temperatura da sonda aquecida igual a 100 °C. O método de aquisição dos espectros foi em *full*

scan entre os m/z 200 e 1600, resolução de 70000, controlo automático de ganho de 1×10^6 e 2 microscans. Os 10 iões mais intensos foram sucessivamente fragmentados na célula de colisões HCD. A energia de colisão variou entre 25, 30 e 35 eV. Os espetros de MS/MS foram adquiridos com uma resolução igual a 17500, ganho automático de controlo 1×10^5 , 1 microscan e janela de isolamento de m/z 35-700. O limite para a seleção de iões foi 2×10^4 contagens. O máximo de iões acumulados permitidos foi 100 ms para os espetros de MS e 50 ms para os espetros de MS/MS. A exclusão dinâmica foi definida para os 60 s. A análise dos espetros adquiridos foi efetuada através do programa de análise de dados *Xcalibur v3.0* (Thermo Fisher Scientific, EUA).

II. Resultados

De modo a estudar o lipidoma da *G. turuturu* começou-se por analisar o perfil de AG em duas fases do ciclo de vida, a fase reprodutiva e a fase não reprodutiva (os resultados estão apresentados no ponto 2.1 e 2.2, respetivamente). O perfil de AG de cada fase do ciclo de vida foi analisado consoante o tempo de cultivo e comparando com a alga selvagem de períodos homólogos. Uma vez que a alga em fase não reprodutiva é a mais comercializada optou-se por analisar o perfil de lípidos polares detalhadamente apenas da *G. turuturu* em fase não reprodutiva. Desta forma, será possível ter uma noção maior da composição da alga de interesse, nomeadamente em termos de AG $n-3$ e $n-6$, e lípidos polares. Seguidamente irá ser mostrado os resultados obtidos no perfil de AG da *G. turuturu* em fase reprodutivas e de seguida a análise do lipidoma (perfil de AG e perfil de lípidos polares) da *G. turuturu* em fase não reprodutiva.

2.1. Perfil de ácidos gordos da *G. turuturu* em fase reprodutiva

O perfil de ácidos gordos do extrato lipídico da *G. turuturu* em fase reprodutiva foi caracterizado por análise dos dados obtidos por GC-MS dos ésteres metílicos de ácidos gordos. Na figura 16 está representado um dos cromatogramas obtidos por GC-MS dos AG metilados da *G. turuturu* em fase reprodutiva.

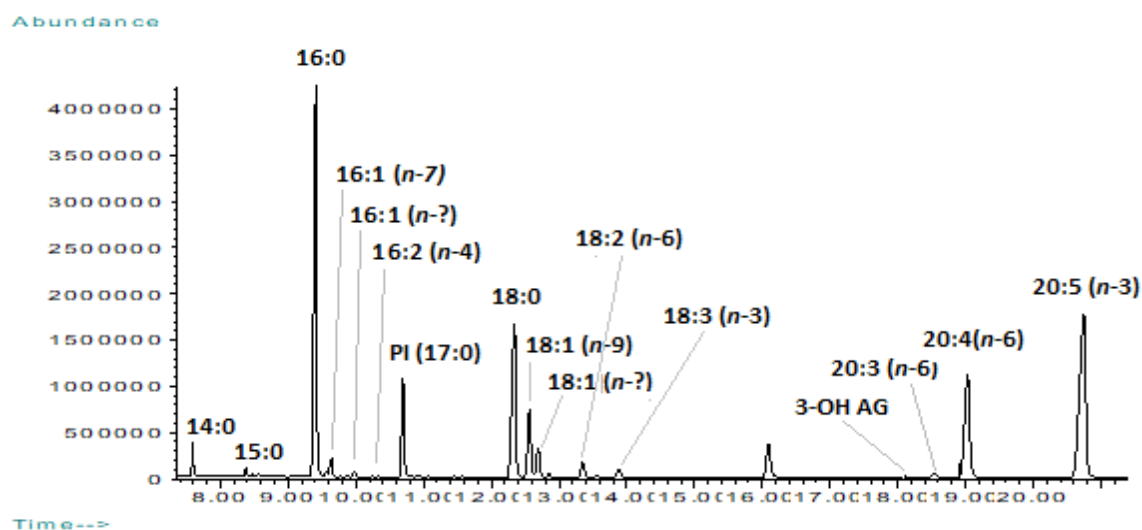


Figura 16 Cromatograma obtido por GC-MS dos AG metilados da *G. turuturu* selvagem em fase reprodutiva. PI: padrão interno

De um modo geral, o perfil de ácidos gordos inclui os ácidos gordos 14:0, 15:0, 16:0, 16:1(*n*-7), 16:2(*n*-4), 17:1, 18:0, 18:1(*n*-9), 18:2(*n*-6), 18:3(*n*-6), 18:3(*n*-3), 20:0, 3-OHAG, 20:3(*n*-6), 20:4(*n*-6) e 20:5(*n*-3) dos quais 16:0, 18:0, 20:4(*n*-6) e 20:5(*n*-3) são os mais abundantes. Na figura 17 está representado o perfil de AG da *G. turuturu* em fase reprodutiva durante o cultivo experimental em IMTA.

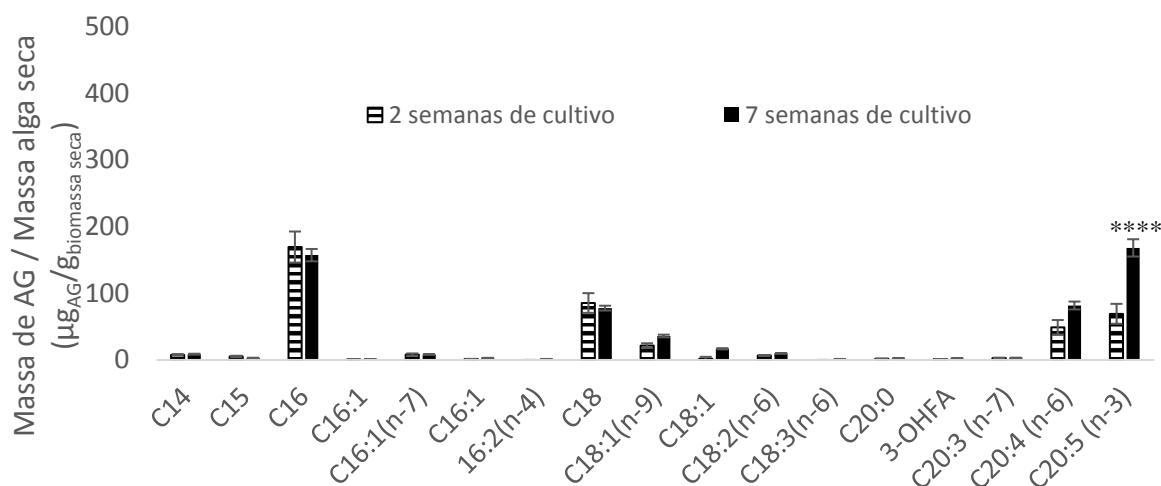


Figura 17 Perfil de ácidos gordos da *G. turuturu* em fase reprodutiva durante o cultivo em IMTA, determinada por GC-MS de ésteres metilados de ácidos gordos. Média \pm erro padrão de triplicados. Nível de significância: **** $p < 0.0001$

Pela observação do gráfico vemos que durante o cultivo a fase reprodutiva da *G. turuturu* tem os mesmos AG maioritários e em que a maioria deles não apresenta variações na sua abundância, uma vez que os AG encontrados em ambas as amostras são os mesmos. No entanto os AG 16:2(*n*-4) e

18:3(*n*-6) só foram detetados após a 7^a semana de cultivo, mas em quantidades extremamente baixas. Quanto à quantidade de cada AG presente na *G. turuturu* em fase reprodutiva verificamos que durante o cultivo não há variações significativas exceto para o ácido gordo 20:5(*n*-3) mais conhecido como EPA. Deste modo, verificamos que após 7 semanas de cultivo o EPA encontra-se aumentado. O perfil de AG da *G. turuturu* em fase reprodutiva em ambiente selvagem está representado na figura 18.

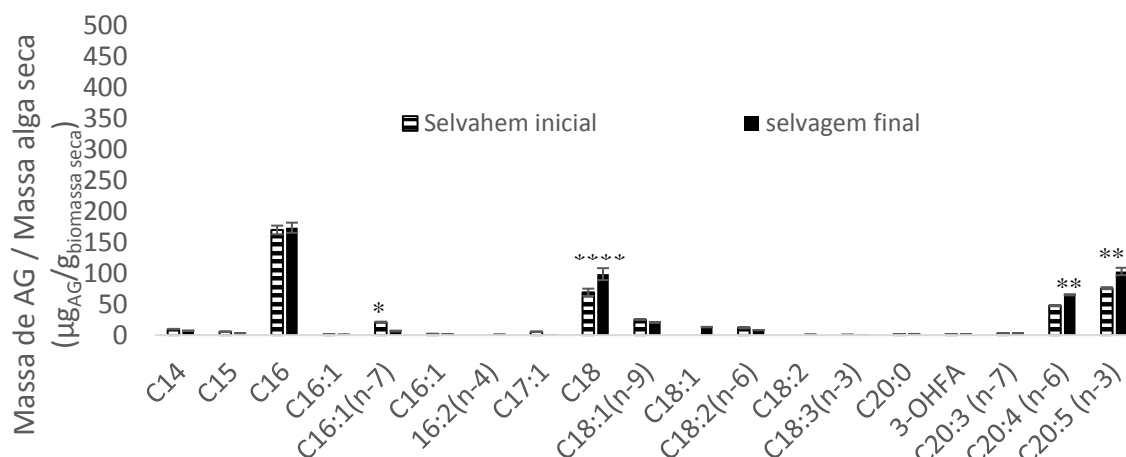


Figura 18 Perfil de ácidos gordos da *G. turuturu* em fase reprodutiva em ambiente selvagem, determinada por GC-MS de ésteres metilados de ácidos gordos. Média \pm erro padrão de triplicados. Nível de significância: * $p < 0.05$ ** $p < 0.01$ *** $p < 0.001$ **** $p < 0.0001$

Através da observação do gráfico anterior conseguimos perceber que ambos têm os mesmos ácidos gordos, exceto o AG 16:2(*n*-4) que existe apenas na selvagem final e o 18:3(*n*-3) que existe apenas na alga selvagem final, ambos em quantidades muito baixa. Quanto à abundância dos AG verificam-se algumas diferenças significativas nos AG presentes em maior quantidade na *G. turuturu* em fase reprodutiva selvagem nas duas amostras. Assim, observamos que o AG 16:1(*n*-7) se encontra aumentado na alga selvagem inicial enquanto que os AG 18:0, 20:4(*n*-6) e 20:5(*n*-3) estão aumentados na alga selvagem. Comparando estes dois gráficos anteriores verifica-se que em cultivo há menos variação na quantidade dos AG evidenciando uma das vantagens do cultivo em aquacultura que é a reprodutibilidade. A figura 19 permite ter uma visão geral da variação no perfil de AG da *G. turuturu* em fase reprodutiva tanto em cultivo como em ambiente selvagem.

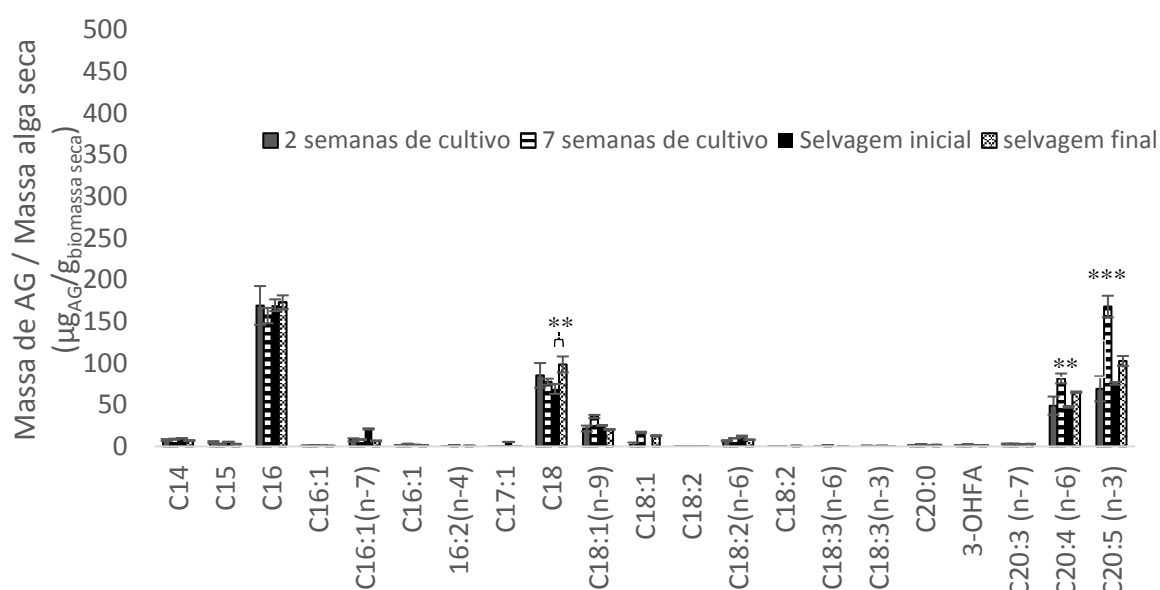


Figura 19 Perfil de ácidos gordos da *G. turuturu* em fase reprodutiva em diferentes ambientes determinada por GC-MS de ésteres metilados de ácidos gordos. Média \pm erro padrão de triplicados. Nível de significância: *p < 0.05 ** p < 0.01 *** p < 0.001 **** p < 0.0001

De um modo geral, o perfil de ácidos gordos mantém-se entre a alga de cultivo e a alga selvagem. No entanto, os AG 17:1 e 18:3(n-3) só foram detetados nas algas selvagens iniciais e os AG 18:1 e 16:2(n-4) só foram detetados às 7 semanas de cultivo e na alga selvagem final. Porém estes AG encontram-se em concentrações muito baixas e, portanto, estas diferenças não são significativas. Por outro lado, observa-se que a abundância de cada AG varia ligeiramente. Verificamos que às 7 semanas observa-se um aumento significativo de 20:4(n-6) e 20:5(n-3) mesmo quando comparado com as algas selvagens. Deste modo verifica-se que durante o cultivo as variações de AG significativas podem estar relacionadas com o aumento de lípidos totais registado durante o cultivo. A presença dos PUFA 20:4(n-6) e 20:5(n-3) é importante uma vez que estes estão relacionados com diversos efeitos benéficos para a saúde (37). Tendo em conta o grupo de AG presentes na *G. turuturu* em fase reprodutiva verificamos que tanto em cultivo como selvagem há entre 43 a 62 % de AG saturados (SFA, sigla em inglês), 8 a 12% de ácidos gordos monoinsaturados (MUFA, sigla em inglês) e entre 30 a 46 % de PUFA (Figura 20).

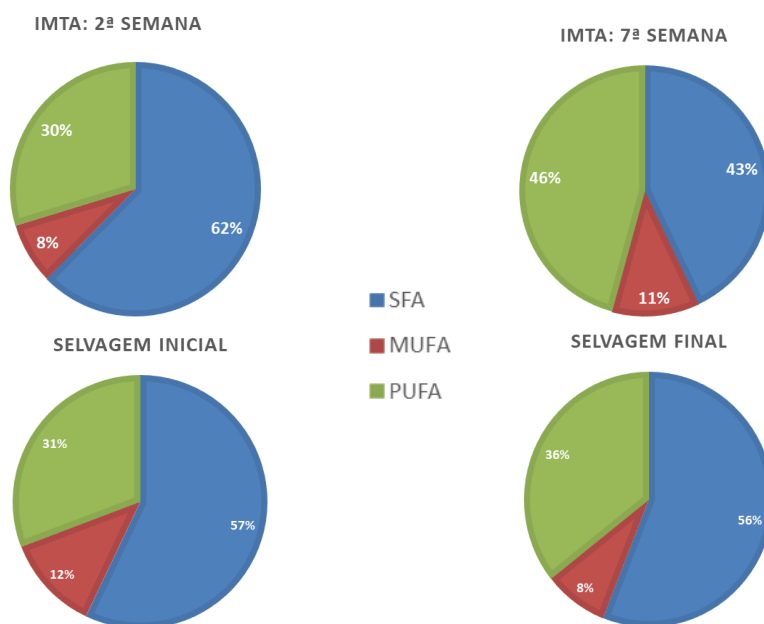


Figura 20 Percentagem de ácidos gordos saturados (SFA), monoinsaturados (MUFA) e polinsaturados (PUFA) nas algas de cultivo (acima) e selvagens (abaixo) da *G. turuturu* em fase não reprodutiva.

Através da figura acima podemos verificar que a maior percentagem de PUFA foi detetada na alga de cultivo após 7 semanas em IMTA e uma maior quantidade de SFA na alga após 2 semanas de cultivo em IMTA, a quantidade de MUFA não variou muito durante o estudo tanto na alga selvagem como na alga cultivada em IMTA. Os rácios $n-6/n-3$ calculados neste estudo para a *G. turuturu* foram de 0,82 para a selvagem inicial, 0,85 para a alga cultivada 2 semanas em IMTA, 0,57 para as 7 semanas de cultivo e 0,74 para a alga selvagem final.

2.2. Perfil de ácidos gordos da *G. turuturu* em fase não reprodutiva

O perfil de ácidos gordos do extrato lipídico foi caracterizado por análise de dados obtidos por GC-MS dos ésteres metílicos de ácidos gordos. De seguida está representado um dos cromatogramas obtidos por GC-MS dos AG metilados da *G. turuturu* em fase não reprodutiva (Figura 21).

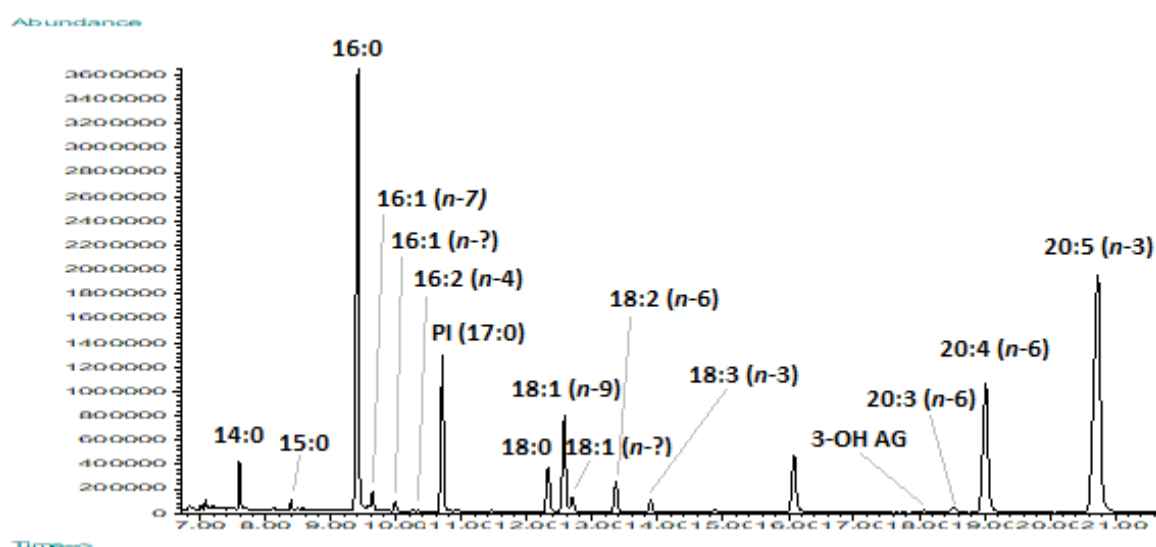


Figura 21 Cromatograma obtido por GC-MS dos AG metilados da *G. turuturu* selvagem em fase não reprodutiva. PI: padrão interno

De um modo geral, o perfil de AG inclui os ácidos gordos 14:0, 15:0, 16:0, 16:1(*n*-7), 16:2(*n*-4), 18:0, 18:1(*n*-9), 18:2(*n*-3), 18:2(*n*-6), 18:3(*n*-6), 18:3(*n*-3), 20:0, 3-OHAG, 20:3(*n*-6), 20:4(*n*-6) e 20:5(*n*-3) dos quais 16:0, 20:4(*n*-6) e 20:5(*n*-3) são os mais abundantes. Na figura 22 está representado o perfil de AG da *G. turuturu* em fase não reprodutiva durante o cultivo.

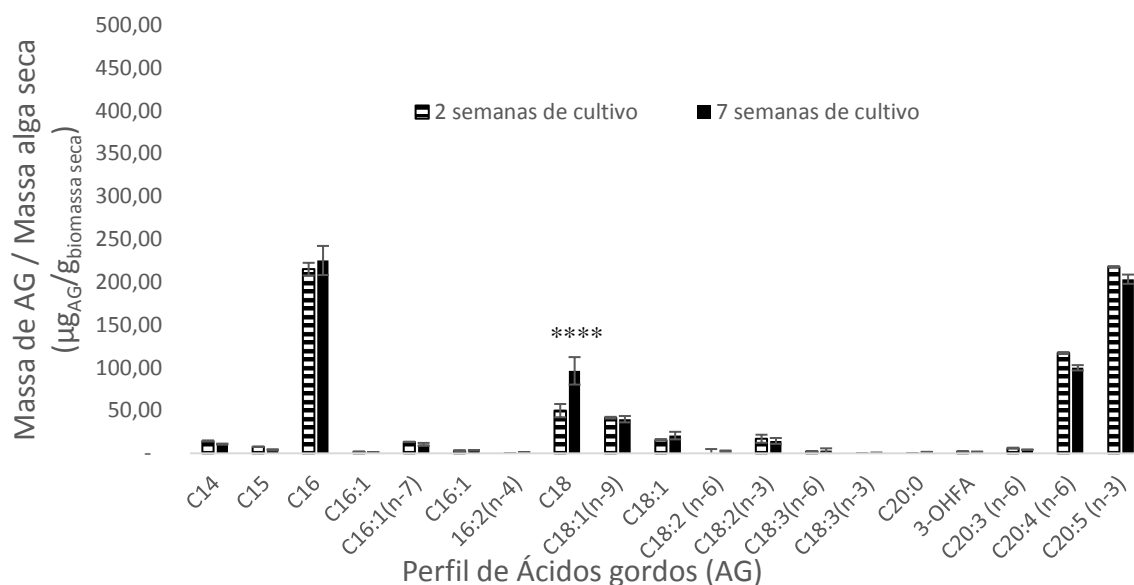


Figura 22 Perfil de ácidos gordos da *G. turuturu* em fase não reprodutiva durante o cultivo em IMTA determinada por GC-MS de ésteres metilados de ácidos gordos. Média \pm erro padrão de triplicados. Nível de significância: **** $p < 0.0001$

Através do gráfico acima verificamos que o perfil da *G. turuturu* não reprodutiva se mantém durante o cultivo em IMTA. Para além disso observamos que a abundância de cada AG não varia significativamente durante o cultivo em IMTA, exceto para o AG 18:0 em que se regista um aumento às 7 semanas de cultivo. Na figura seguinte está representada a variação do perfil de AG da *G. turuturu* não reprodutiva selvagem durante o tempo da experiência.

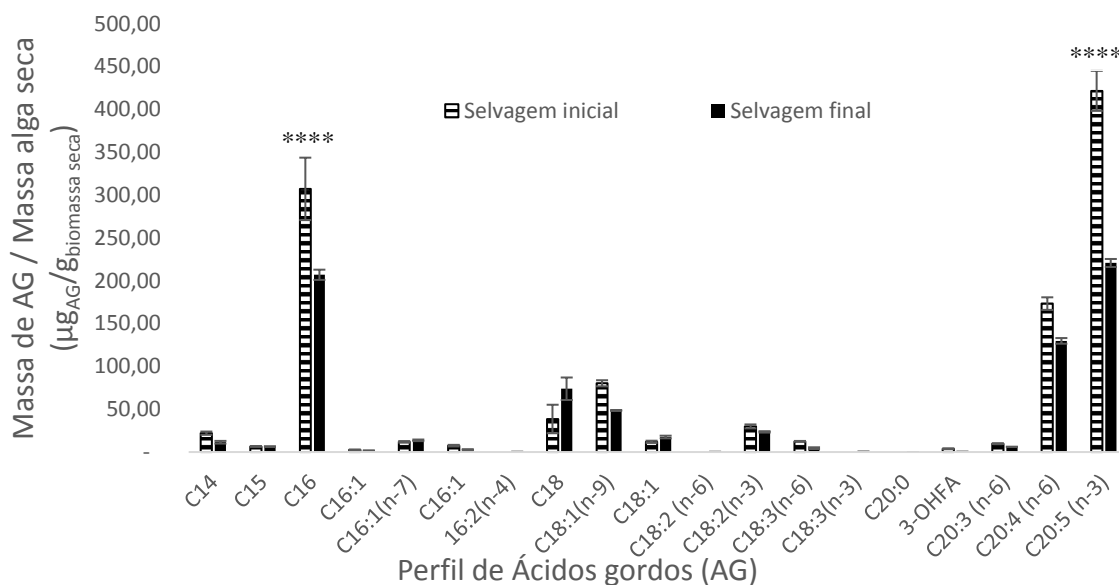


Figura 23 Perfil de ácidos gordos da *G. turuturu* em fase não reprodutiva selvagem determinada por GC-MS de ésteres metilados de ácidos gordos. Média \pm erro padrão de triplicados. Nível de significância: **** $p < 0.0001$

Segundo o gráfico acima observamos mais uma vez que o perfil de AG da *G. turuturu* selvagem não varia ao longo do tempo. No entanto verificamos que há variação na abundância desses AG ao longo do tempo. Durante o ensaio registámos uma diminuição significativa dos AG 16:0 e 20:5(n-3) na *G. turuturu* em fase não reprodutiva em ambiente selvagem. Estas variações podem estar relacionadas com as condições ambientais registadas. Comparando a figura 22 e 23 é possível constatar que foram registadas maiores variações em ambiente selvagem do que em cultivo evidenciando a reprodutibilidade dos sistemas de cultivo. Olhando agora de um modo mais geral, na figura 24 estão representados os perfis de AG da *G. turuturu* em fase não reprodutiva tanto em cultivo como selvagem.

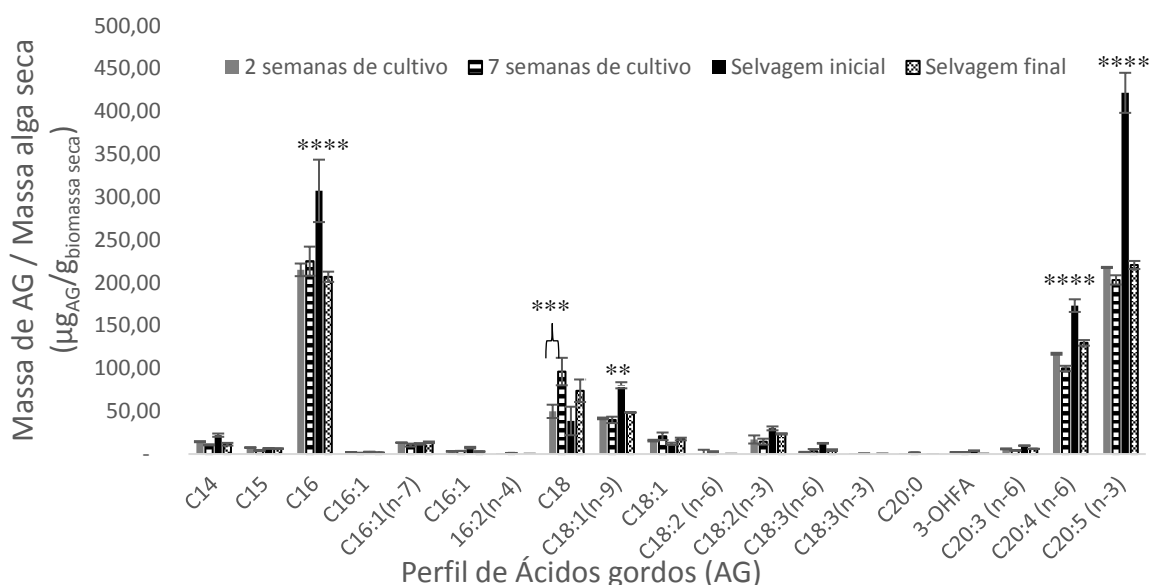


Figura 24 Perfil de ácidos gordos da *G. turuturu* em fase não reprodutiva selvagem e em cultivo determinada por GC-MS de ésteres metilados de ácidos gordos. Média \pm erro padrão de triplicados. Nível de significância: ** $p < 0.01$ ** $p < 0.001$ **** $p < 0.0001$

De um modo geral e como verificado anteriormente o perfil de ácidos gordos mantém-se entre a alga de cultivo e a alga selvagem. No entanto, o AG 18:3 ($n-3$) só foi detetado em ambiente selvagem e os AG 20:0 e 16:2 ($n-4$) só foram detetados às 7 semanas de cultivo, porém encontravam-se todos em concentrações muito baixa e, portanto, essas diferenças não são significativas. Por outro lado, observa-se que a abundância de cada AG varia. A alga selvagem inicial é a que contém maior quantidade dos AG mais abundantes 16:0, 20:4($n-6$) e 20:5($n-3$). Esta observação vai de encontro com a composição bioquímica da alga uma vez que a alga selvagem inicial era a que continha maior quantidade de lípidos totais. Nas outras condições as alterações não foram significativamente diferentes exceto para o 18:0 entre a 2ª e 7ª semana de cultivo, no entanto a percentagem de lípidos totais mostra uma diminuição durante o cultivo sugerindo alterações a nível dos lípidos apolares, nomeadamente esteróis.

Quanto aos grupos de AG verificamos que de um modo geral a *G. turuturu* em fase não reprodutiva apresenta entre 33 a 43 % de AG saturados (SFA, sigla em inglês), 10 e 11% de ácidos gordos monoinsaturados (MUFA, sigla em inglês) e entre 47-57 % de PUFA (Figura 25).

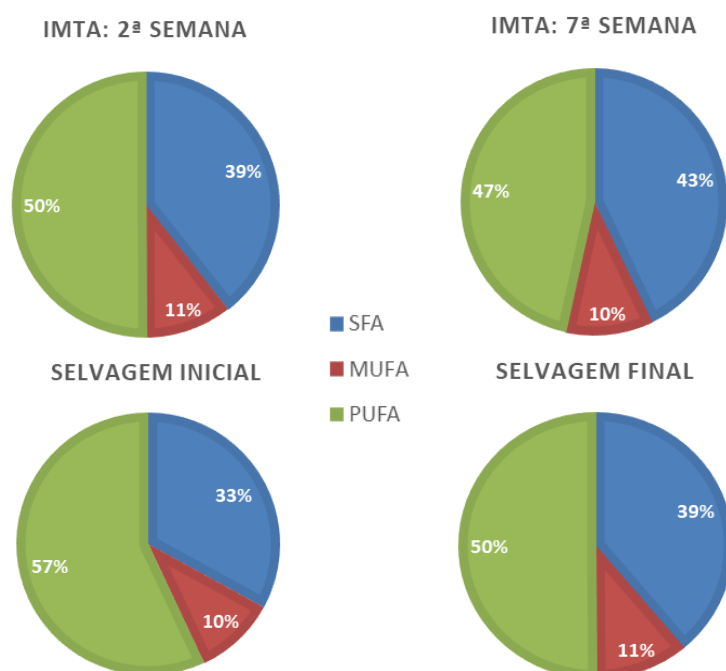


Figura 25 Percentagem de ácidos gordos saturados (SFA), monoinsaturados (MUFA) e polinsaturados (PUFA) nas algas de cultivo (acima) e selvagens (abaixo) da *G. turuturu* em fase não reprodutiva.

Segundo os gráficos acima verificamos que a maior percentagem de PUFA foi detetada na alga selvagem inicial e uma maior quantidade de SFA na alga após 7 semanas de cultivo em IMTA, a quantidade de MUFA manteve-se durante o estudo tanto para as algas selvagens como de cultivo. Os rácios $n-6/n-3$ calculados neste estudo para a *G. turuturu* foram de 0,43 para a selvagem inicial, 0,59 para a alga cultivada 2 semanas, 0,52 para as 7 semanas de cultivo e 0,58 para a alga selvagem final. Assim, verifica-se que a *G. turuturu* em fase não reprodutiva selvagem colhida inicialmente é a que contém menor rácio seguida da alga recolhida após 7 semanas de cultivo.

Na literatura existem já 4 estudos que analisam o perfil de AG de *G. turuturu* selvagem em diferentes países porém não diferenciam as fases do ciclo de vida (17,19,20,22). Comparando esses estudos com os resultados obtidos verifica-se que em termos de AG mais abundantes a *G. turuturu* mantém o seu perfil independentemente da região, ou seja, os ácidos gordos 16:0, 20:4 (n-6) e 20:5 (n-3) são os mais abundantes em todos os estudos. Porém há uma ligeira variação na abundância do 18:0 e 18:1. Nos estudos da literatura apenas o de Denis *et al.* reporta o AG 18:0 mais abundante do que o AG 18:1 os restantes estudos verificaram maior abundância de 18:1 do que 18:0 (33). No nosso estudo verificamos que a fase não reprodutiva da *G. turuturu* selvagem inicial é a única que apresenta maior abundância de 18:1 do que de 18:0, as outras algas apresentam a relação inversa. O estudo de Rodrigues *et al.* foi o único que também identificou o AG 16:2 (n-4) mesmo que em pequena abundância. Todos os estudos reportam a presença de 18:1 (n-7) em alguma abundância, porém neste

estudo não foi identificado (20). No entanto como não foi possível identificar com certeza a posição da insaturação de um dos 18:1 tudo leva a crer que se trataria de um $n-7$. Hotimchenko *et al.* foram os únicos que também identificaram o AG 20:3($n-6$), em ambos os estudos este AG encontra-se com pouca abundância (17). Para além disso, no nosso estudo foi identificado um AG hidroxilado no carbono 3, contudo o tamanho da cadeia não foi possível de identificar. No entanto, observa-se que o AG hidroxilado sai na zona do C20 e sabendo que um grupo hidroxilo aumenta a polaridade do AG, mas também a volatilidade podemos deduzir que se trate de um AG entre 16-18 carbonos. Por outro lado, na literatura tanto Kendel *et al.* como Denis *et al.* identificaram a presença de um 3-OH 17:0 na *G. turuturu* selvagem, um AG típico de bactérias (19,22). Portanto, tudo leva a crer que o tamanho da cadeia do AG 3-OH identificado no presente estudo seja de 17 carbonos. Verifica-se que este AG apenas não foi detetado na *G. turuturu* selvagem final. Contudo, como este AG se encontrava em concentrações muito baixas poderia estar abaixo do limite de deteção do instrumento já que em ambos os estudos verificaram que este AG é menos abundante no inverno.

De um modo geral o perfil de AG é maioritariamente constante entre as duas fases do ciclo de vida. Contudo foi visto que as abundâncias de AG das duas fases do ciclo de vida apresentaram comportamentos distintos, o que pode ter sido potenciado pelas diferentes densidades utilizadas para cada condição. Às condições utilizadas verificou-se que a *G. turuturu* em fase reprodutiva regista um aumento de EPA durante o cultivo enquanto que a fase não reprodutiva regista um aumento de 18:0 das 2 semanas de cultivo para as 7 semanas de cultivo. No entanto, em ambiente selvagem verificamos que a fase reprodutiva registou um aumento de 18:0 20:4($n-6$) e 20:5($n-3$) entre a recolha inicial e a final enquanto que a fase não reprodutiva registou diminuição de 16:0 e 20:5($n-3$) nas mesmas alturas de recolha. Esta última observação evidencia as diferenças entre as duas fases uma vez que ambas as fases foram recolhidas do mesmo local. Verifica-se que para alga selvagem recolhida em novembro a fase não reprodutiva apresenta maior percentagem de lípidos totais e desta forma tem maior quantidade dos AG mais abundantes. Para além disso verifica-se que a percentagem de PUFA desta alga selvagem em fase não reprodutiva é superior (57%) do que da mesma alga em fase reprodutiva (31%). Um outro aspeto que ficou evidenciado foi o facto de as algas em cultivo independentemente da fase do ciclo de vida apresentarem uma abundância de AG mais constante do que em ambiente selvagem.

Um outro parâmetro que tem vindo a ganhar relevância é o rácio $n-6/n-3$. Neste sentido, estudos reportam a importância do balanço entre AG $n-6/n-3$ na diminuição do risco de doenças cardiovasculares (42,43). Geneticamente o ser humano está adaptado a uma dieta em que o rácio $n-6/n-3$ é 1 porém hoje em dia a dieta ocidental tem um rácio entre 15 e 17 (43). A *World Health Organization* (WHO) recomenda o consumo diário de 5-8% da ingestão diária de energia de PUFA $n-6$ e 1-2% da ingestão diária de energia de PUFA $n-3$. Assim, verifica-se que a *G. turuturu* em fase

não reprodutiva selvagem inicial e após 7 semanas de cultivo são as que contêm menor rácio $n-6/n-3$ apresentando um valor de 0,43 e 0,52, respetivamente. A média dos valores registados no nosso estudo corroboram com os reportados por Denis *et al.* (0,6) e Kendel *et al.* (0,7) e estão ligeiramente acima dos reportados por Rodrigues *et al.* (0,46) (19,20,22). Apesar das diferenças apontadas os rácios encontram-se muito abaixo dos recomendados pela WHO, mas também abaixo do rácio de 1 para o qual o ser humano está adaptado geneticamente. Desta forma verifica-se que a *G. turuturu* reprodutiva tem um rácio $n-6/n-3$ capaz de diminuir o risco de doenças cardiovasculares.

2.3. Estudo do perfil de lípidos polares da *G. turuturu* em fase não reprodutiva

O perfil de lípidos polares da *G. turuturu* em fase não reprodutiva foi estudado usando uma abordagem lipidómica. Decidimos estudar o perfil da *G. turuturu* em fase não reprodutiva pois esta é a alga que é mais comercializada. Pretendemos assim com este trabalho criar novo conhecimento sobre os lípidos polares que podem ser fontes de AG $n-3$, $n-6$ ou compostos bioativos e assim acrescentar valor a esta macroalga produzida em IMTA. Neste trabalho, estudou-se o perfil de lípidos polares da *G. turuturu* em fase não reprodutiva após 7 semanas de cultivo usando HPLC-MS e MS/MS. A análise por HPLC-MS forneceu a informação estrutural do lipidoma da *G. turuturu*, nomeadamente o perfil de lípidos polares e a composição das suas espécies moleculares. Esta abordagem lipidómica permitiu a identificação dos constituintes moleculares dos diferentes grupos de lípidos, incluindo fosfolípidos glicolípidos e betaínas. Foi a primeira vez que se efetuou esta abordagem lipidómica para a *G. turuturu*. Nas próximas secções será identificada a composição molecular de cada classe de lípidos.

2.3.1. Perfil de Glicolípidos da *G. turuturu*

No extrato lipídico da *G. turuturu* foram identificados por LC-MS glicolípidos presentes na *G. turuturu* pertencentes as classes de MGDG, DGDG, SQDG e SQMG. Os glicoglicerolípidos existem em grande abundância nas algas (89). A estrutura básica dos glicoglicerolípidos é caracterizada por um 1,2-diacil-*sn*-glicerol com um mono- ou oligossacarídeo ligado à posição *sn*-3 da cadeia de glicerol.

Sulfoquinovosildiacilgliceróis e sulfoquinovosilmonoacilgliceróis (SQDG e SQMG)

As SQDG e SQMG foram analisados no modo de ionização negativo e observadas como iões $[M-H]^-$. A figura 26 mostra o espectro de LC-MS representativas para cada classe, em que se pode observar os iões que permitiram identificar as espécies moleculares de SQDG e SQMG do espectro obtido por HPLC-MS que permite a identificação do seu peso molecular.

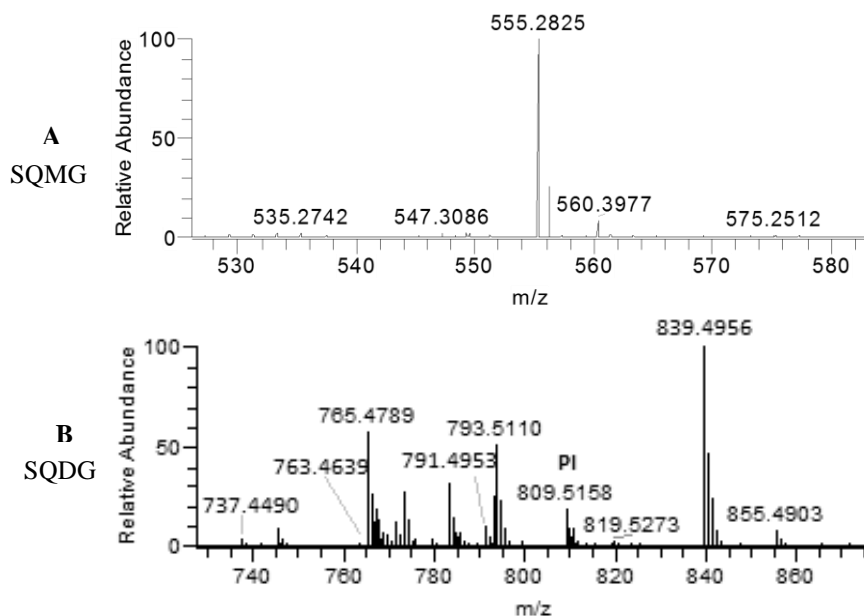


Figura 26 Espectro de HPLC-MS das classes SQMG (A) e SQDG (B) obtidos no modo negativo com a formação de iões $[M-H]^-$ da *G. turuturu* após 7 semanas de cultivo em IMTA. Eixo do Y: abundancia relativa considerando o ião mais abundante como 100%; eixo do X: m/z de cada ião; PI: padrão interno

A análise dos espectros MS/MS mostrou-se essencial para a confirmação da composição da espécie molecular quer em termos do grupo polar com a nível de ácidos gordos. A fragmentação típica obtida nos espectros MS/MS dos iões $[M-H]^-$ das SQDG é a presença de um ião fragmento com m/z 225 que corresponde ao grupo sulfoquinovosil permitindo a confirmação da cabeça polar destes lípidos. Nestes espectros observa-se também a presença dos iões fragmento resultantes da perda da cadeia do ácido gordo assim como o anião carboxilato do ácido gordo ($RCOO^-$). No caso da Figura 27 verifica-se a presença de dois iões carboxilato, o AG 16:0 e o 20:5 com m/z 255 e 301, respetivamente.

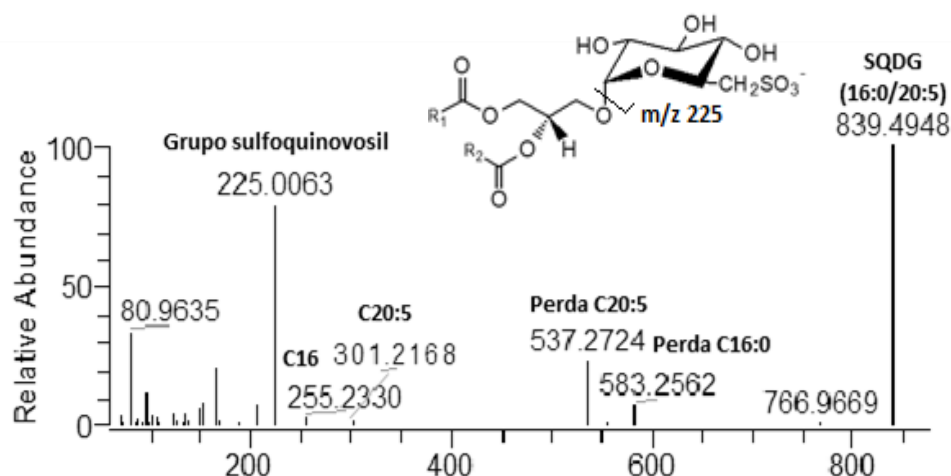


Figura 27 Estrutura geral dos SQDG (acima) e espectro MS/MS do SQDG em $[M-H]^-$ com m/z 839,49 (16:0/20:5) com as fragmentações padrão dos SQDG.

Os espectros de SQMG são similares aos dos SQDG uma vez que a cabeça polar é a mesma, e, portanto, também apresentam um pico com m/z 225. No entanto, os SQMG têm apenas um ácido gordo substituinte, neste sentido o espectro apresenta apenas o anião carboxilato de um ácido gordo. No caso da figura 28 o anião carboxilato presente corresponde ao AG 16:0.

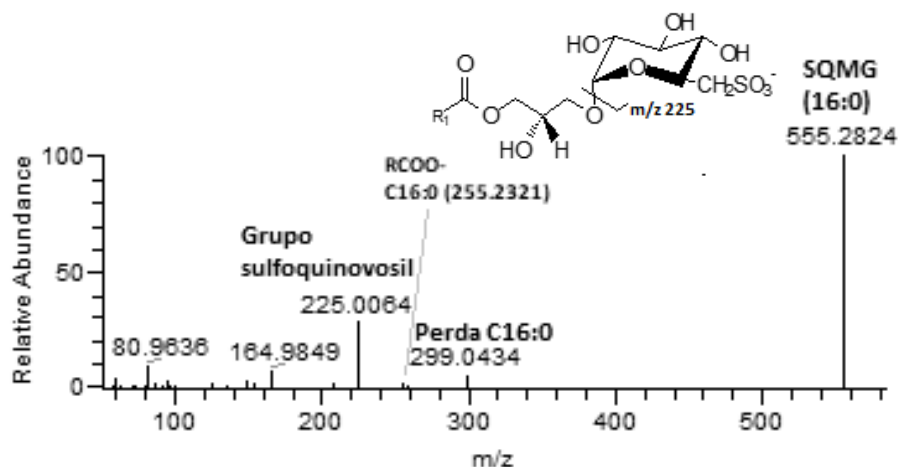


Figura 28 Estrutura geral dos SQMG (acima) e espectro MS/MS do SQMG em $[M-H]^-$ com m/z 555,28 (16:0) com as fragmentações padrão dos SQMG.

Baseado na análise por LC-MS e MS/MS foram identificadas 11 espécies moleculares de SQDG e 1 espécie molecular de SQMG. A composição em ácidos gordos de cada espécie molecular foi obtida de acordo com a interpretação do espectro MS/MS correspondente. A espécie de SQDG mais abundantemente apresentava um m/z 839.49, correspondendo ao SQDG (16:0/20:5). A espécie com m/z 765,48 foi a segunda espécie mais abundante, que corresponde ao SQDG 14:0/16:0. Para além

dos diversos SQDG detetado foi possível detetar uma SQMG com m/z de 555,28 que corresponde ao SQMG (16:0). Na tabela 6 estão listados todos os SQDG e SQMG identificados.

Tabela 6 Identificação dos iões $[M-H]^-$ de SQMG e SQDG observados no espectro de HPLC-MS e a sua composição em ácidos gordos. Os valores de m/z apresentados foram os observados nesta experiência. Os números entre parênteses (C: N) indicam o número de átomos de carbono (C) e de duplas ligações (N) nas cadeias de ácidos gordos substituintes.

$[M-H]^- m/z$	Classe de lípidos (C: N)	Cadeias de ácidos gordos
737,4	SQDG (28:0)	12:0/16:0
763,5	SQDG (30:1)	14:0/16:1
765,5	SQDG (30:0)	14:0/16:0
785,5	SQDG (32:4)	14:0/18:4
789,5	SQDG (32:2)	14:1/18:1
791,5	SQDG (32:1)	16:0/16:1
793,5	SQDG (32:0)	16:0/16:0
811,5	SQDG (34:5)	14:0/20:5
819,5	SQDG (34:1)	18:1/16:0
839,5	SQDG (36:5)	20:5/16:0
855,5	SQDG (36:5-OH)	16:0/20:5-OH
555,3	SQMG (16:0)	16:0

Digalactosildiacilglicerol (DGDG) e Monogalactosildiacilglicerol (MGDG)

Os digalactosildiacilgliceróis (DGDG) e os monogalactosildiacilgliceróis (MGDG) foram analisados por HPLC-MS no modo positivo e as espécies moleculares foram identificadas como iões $[M+NH_4]^+$ e $[M+Na]^+$ (figura 29). Os iões $[M+Na]^+$ foram formados apenas nas espécies mais abundantes.

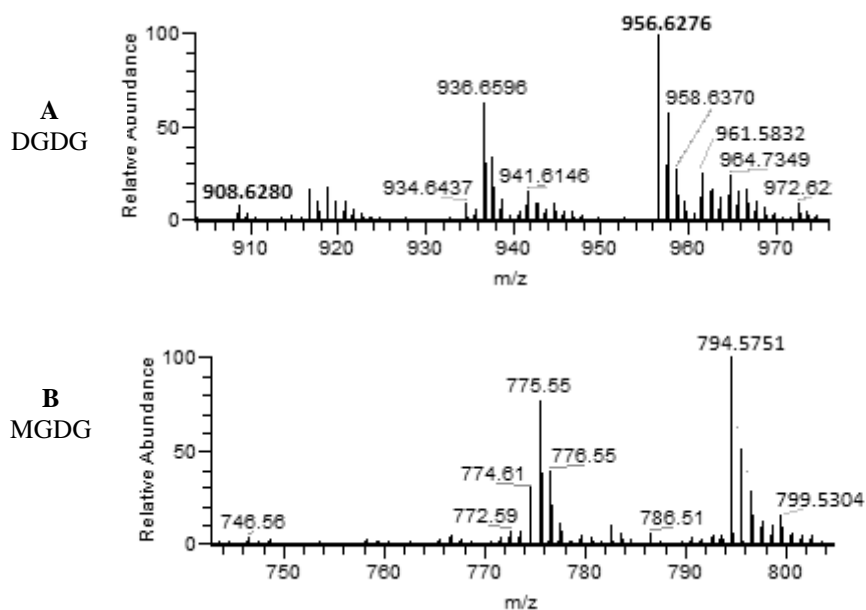


Figura 29 Espectro de HPLC-MS das classes DGDG (A) e MGDG (B) obtidos no modo positivo com a formação de iões $[M+NH_4]^+$ da *G. turuturu* após 7 semanas de cultivo em IMTA. Eixo do Y: abundância relativa considerando o ião mais abundante como 100%; eixo do X: m/z de cada ião;

A confirmação da composição estrutural das diferentes espécies moleculares de DGDG e MGDG tanto em termos do grupo polar como dos ácidos gordos foi efetuada através da análise dos espectros MS/MS. Na figura 30 podemos ver o espectro MS/MS e o respetivo padrão de fragmentação dos DGDG. No padrão de fragmentação verifica-se a perda neutra de duas hexoses e amónia (perda de 359 Da) correspondendo à cabeça polar permitindo a confirmação da classe de lípidos. Para além disso, no espectro verifica-se também a presença dos picos correspondentes a cada ácido gordo mais o glicerol resultante da perda neutra da cabeça conjuntamente com um dos ácidos gordos substituintes. Na figura 30 podemos ver a presença dos picos com m/z 313 e 359 que correspondem aos AG 16:0 e 20:5 mais glicerol (57 Da), respetivamente.

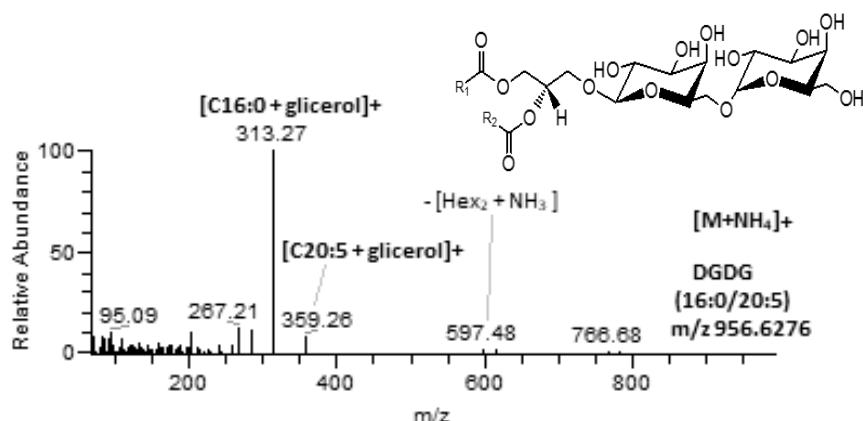


Figura 30 Estrutura geral dos DGDG (acima) e espectro MS/MS do DGDG em $[M+NH_4]^+$ com m/z 956.63 (16:0/20:5) com as fragmentações padrão dos DGDG.

Os espectros referentes aos MGDG apresentam um padrão de fragmentação semelhante aos DGDG, apresentando a perda do grupo polar (perda de hexose) e amónia, ou seja, a perda de 197 Da (Figura 31). Para além disso o padrão de fragmentação apresenta também o pico correspondente ao ácido gordo mais o glicerol que corresponde à perda da cabeça e de um dos ácidos gordos substituintes. Na figura abaixo representada observa-se a presença dos picos m/z 313 e 339 que correspondem aos ácidos gordos 16:0 e 18:1 mais glicerol, respetivamente.

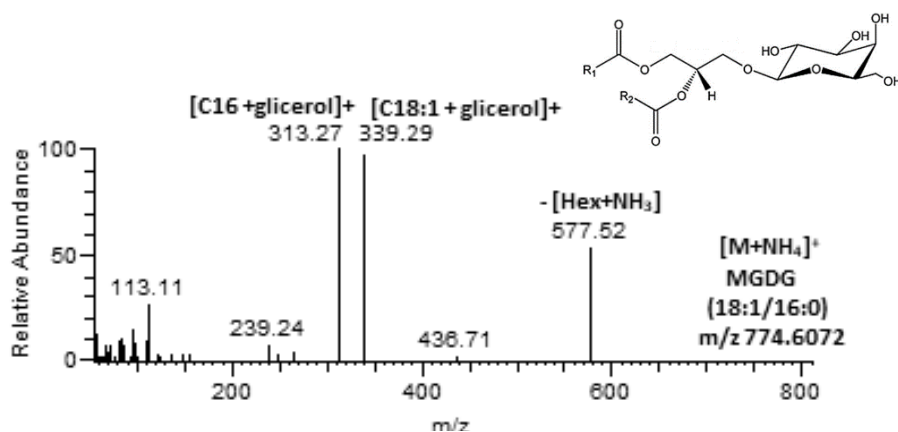


Figura 31 Estrutura geral dos MGDG (acima) e espectro MS/MS do MGDG em $[M+NH_4]^+$ com m/z 956.63 (18:1/16:0) com as fragmentações padrão dos MGDG.

Através da análise do espectro HPLC-MS e MS/MS dos iões $[M+NH_4]^+$ foram identificadas 5 espécies moleculares de DGDG e 8 espécies moleculares de MGDG (tabela 7). A espécie mais abundante de DGDG apresentava m/z de 956,63, correspondendo à DGDG (16:0/20:5). A MGDG mais abundante apresentava um m/z de 794,57 correspondendo à MGDG (16:0/20:5). Na tabela 7 estão listados todos os DGDG e MGDG identificados.

Tabela 7 Identificação dos iões $[M+NH_4]^+$ de MGDG observados no espectro de HPLC-MS. Os números entre parênteses (C: N) indicam o número de átomos de carbono (C) e de duplas ligações (N) nas cadeias de ácidos gordos substituintes. * Sem espectro MS/MS

$[M+NH_4]^+ m/z$	Classe de lípidos (C: N)	Cadeias de ácidos gordos
908,6	DGDG (32:1)	18:1/14:0 e 16:0/16:1
934,6	DGDG (34:2)	18:2/16:0 e 18:1/16:1
936,7	DGDG (34:1)	18:1/16:0
956,6	DGDG (36:5)	16:0/20:5
958,6	DGDG (36:4)	*
772,6	MGDG (34:2)	*
774,6	MGDG (34:1)	18:1/16:0
786,5	MGDG (36:9)	*
790,6	MGDG (36:7)	*
792,6	MGDG (36:6)	*
794,6	MGDG (36:5)	16:0/20:5
796,6	MGDG (36:4)	*
800,5	MGDG (37:9)	*

2.3.2. Perfil de Fosfolípidos (PL) da *G. turuturu*

A análise do perfil de PL presentes na *G. turuturu* após 7 semanas de cultivo através de HPLC-MS permitiu a identificação de 7 classes: PG, lisofosfatidilgliceróis (LPG), PC, lisofosfatidilcolinas (LPC), PE, ácido fosfatídico (PA) e Inositolfosfoceramidas (IPC). Seguidamente irá ser detalhada a composição de cada espécie molecular de cada uma destas classes.

Fosfatidilglicerol (PG) e lisofosfatidilglicerol (LPG)

Os PG e LPG foram identificados por HPLC-MS no modo negativo através de iões $[M-H]^-$. Na figura 33 estão representados os espectros de MS em que se pode observar os iões $[M-H]^-$ correspondente às espécies moleculares de PG.

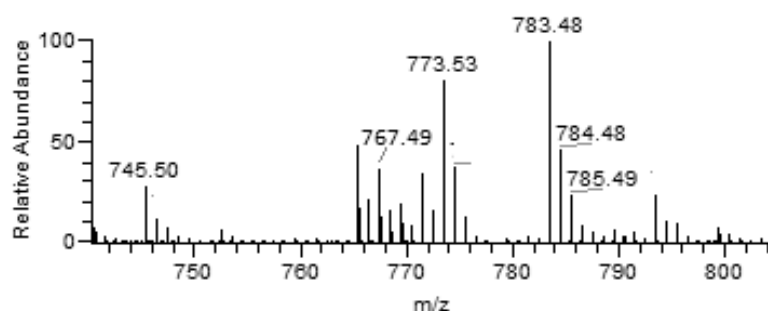


Figura 32 Espectro de HPLC-MS das classes PG obtido no modo negativo com a formação de iões $[M-H]^-$ da *G. turuturu* após 7 semanas de cultivo em IMTA. Eixo do Y: abundância relativa considerando o ião mais abundante como 100%; eixo do X: m/z de cada ião;

Os espectros de LC-MS MS/MS dos iões $[M-H]^-$ de PG mostram os iões produto formados pela perda da cadeia de ácidos gordos tanto na forma ácida como na forma ceto e na forma de anião carboxilato ($RCOO^-$). No espectro MS/MS é possível identificar picos característicos com m/z 171 correspondendo ao glicerol fosfato e m/z 153 que corresponde ao grupo glicerol fosfato menos água. Para além dos picos característicos é possível identificar os aniões carboxilato que permitem a identificação das cadeias de ácidos gordos. Na figura 33 podemos ver o pico com m/z 271 que corresponde ao anião carboxilato do ácido gordo 16:0 hidroxilado (m/z 255 + 16) e o pico com m/z 301 correspondente ao anião carboxilato do AG 20:5.

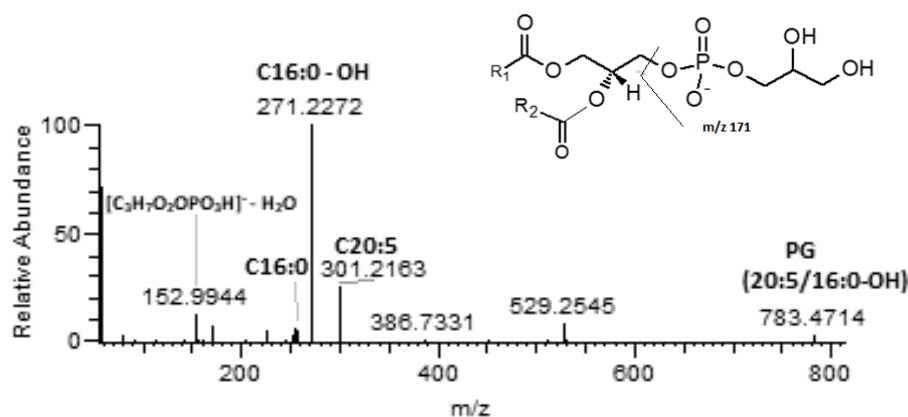


Figura 33 Estrutura geral dos PG (acima) e espectro MS/MS do PG em $[M-H]^-$ com m/z 783.47 (16:0-OH/20:5) com as fragmentações típicas dos PG.

Os espectros de LC-MS/MS dos LPG em termos de picos característicos são semelhantes às PG sendo que as LPG apresentam apenas um anião carboxilato. O espectro apresenta também os picos característicos com m/z 171 e 153 (Figura 34).

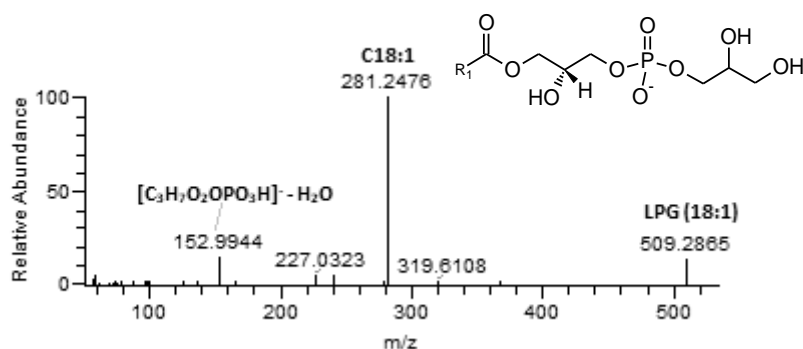


Figura 34 Estrutura geral dos LPG (acima) e espectro MS/MS do PG em $[M-H]^-$ com m/z 509.29 (18:1) com as fragmentações padrão dos LPG.

Através da análise dos espectros de HPLC-MS/MS foi possível identificar 6 espécies de PG e 2 de LPG (Tabela 8). A espécie de PG mais abundante foi detectada a um m/z de 783,47 correspondendo à PG (20:5/16:0-OH). A espécie de LPG mais abundante tem um m/z de 509,25 que corresponde ao LPG (18:1). Na tabela 8 estão listados todos os PG e LPG identificados.

Tabela 8 Identificação dos íons $[M-H]^-$ de PG e LPG observados no espectro de HPLC-MS. Os números entre parênteses (C: N) indicam o número de átomos de carbono (C) e de duplas ligações (N) nas cadeias de ácidos gordos substituintes.

$[M-H]^- m/z$	Classe de lípidos (C: N)	Cadeias de ácidos gordos
745,5	PG (34:2)	16:1/18:1
767,5	PG (36:5)	16:1/20:4 e 16:0/20:5
769,5	PG (36:4)	16:0/20:4 e 18:2/18:2
771,5	PG (36:3)	18:1/18:2
773,5	PG (36:2)	18:1/18:1
783,5	PG(36:5(OH))	20:5/16:0-OH
481,3	LPG (16:1)	16:1
509,2	LPG (18:1)	18:1

Fosfatidilcolina (PC) e lisofosfatidilcolina (LPC)

Os PC foram identificados tanto no modo positivo como iões $[M+H]^+$ como no modo negativo como iões $[M+CH_3COO]^-$ com uma ionização preferencial na forma de $[M+H]^+$. Nos espetros com os iões $[M+H]^+$ é possível confirmar a classe de lípidos, contudo só é possível a identificação dos ácidos gordos presentes através dos iões $[M+CH_3COO]^-$ através da formação dos aniões carboxilato. O espetro correspondente às espécies moleculares detetadas na forma de iões $[M+H]^+$ está representado na figura 35.

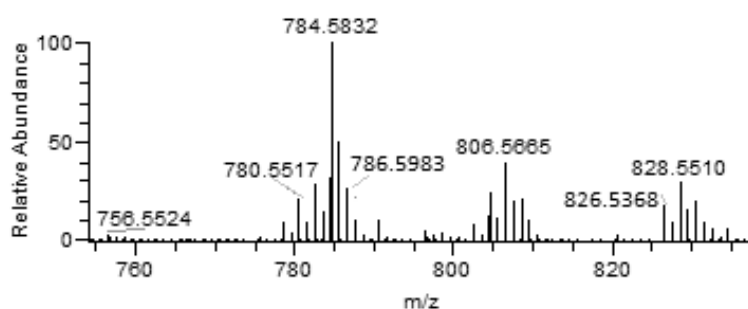


Figura 35 Espetro de HPLC-MS da classes PC obtido no modo negativo com a formação de iões $[M+H]^+$ da *G. turuturu* após 7 semanas de cultivo em IMTA. Eixo do Y: abundancia relativa considerando o ião mais abundante como 100%; eixo do X: m/z de cada ião

Os espetros MS/MS dos iões $[M+H]^+$ PC e LPC mostram um fragmento típico com m/z 184 que corresponde ao grupo polar (fosfocolina) permitindo confirmar a classe de lípidos. No entanto só no espetro $[M+CH_3COO]^-$ é possível identificar os aniões carboxilato ($RCOO^-$) e assim identificar os ácidos gordos. Na figura 36 podemos ver a presença dos dois espetros, tanto os iões $[M+H]^+$ como os iões $[M+CH_3COO]^-$, sendo que no primeiro é possível identificar o grupo polar (m/z 184) e no segundo identificamos a presença de dois picos com m/z 279 e 281 correspondendo aos aniões carboxílicos dos AG 18:2 e 18:1, respetivamente.

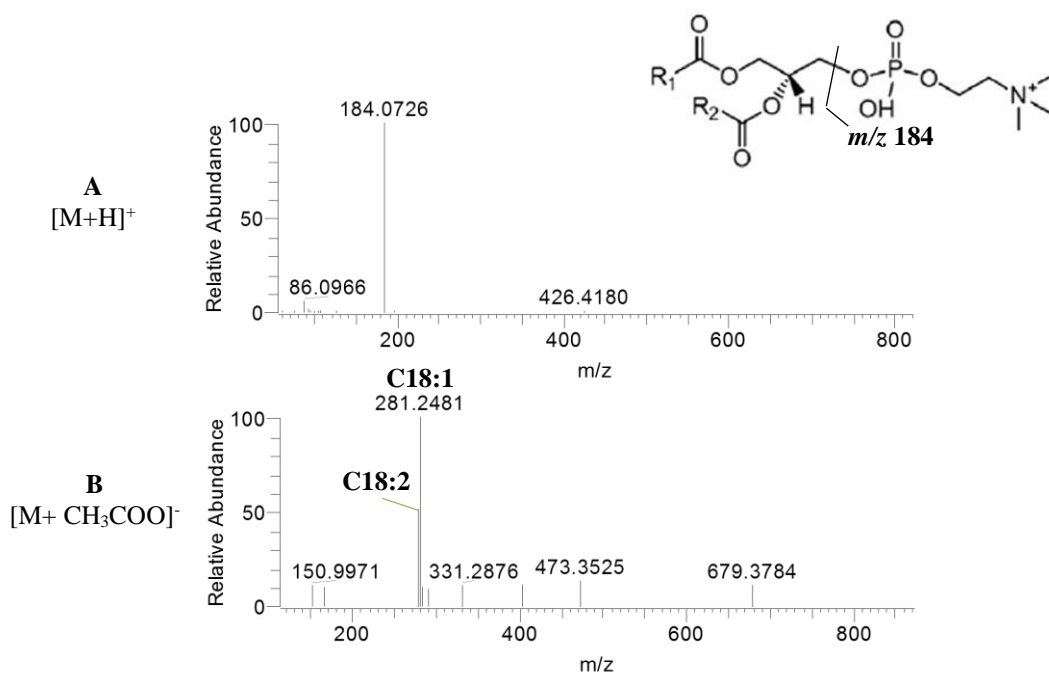


Figura 36 Estrutura geral dos PC (acima), espectro MS/MS dos iões $[M+H]^+$ dos PC em com m/z 784,68 (18:1/18:2) (A) e espectro MS/MS dos iões $[M+CH_3COO]^-$ dos PC em com m/z 842,38 (18:1/18:2) (B) com as fragmentações padrão dos PC.

Os espectros MS/MS dos LPC são semelhantes aos dos PC apresentando o mesmo fragmento típico, o m/z 184 nos iões $[M+H]^+$ correspondente à cabeça polar e o anião carboxilatos presente nos iões $[M+CH_3COO]^-$, no entanto como as LPC apresentam apenas um ácido gordo no espectro em modo negativo é visível apenas um pico (Figura 37).

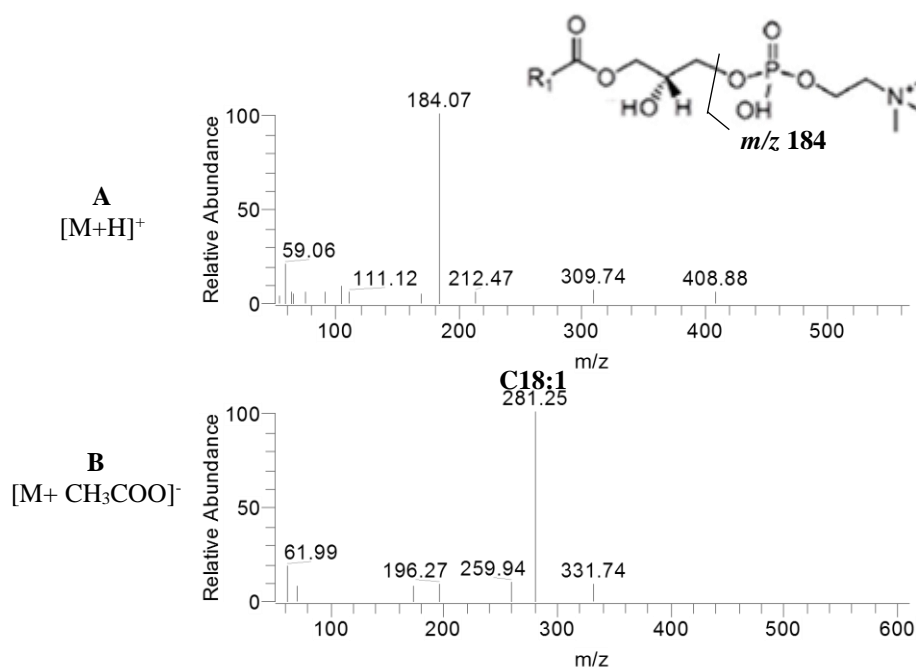


Figura 37 Estrutura geral dos LPC (acima), espectro MS/MS dos iões $[M+H]^+$ dos PC em com m/z 784,68 (18:1/18:2) (A) e espectro MS/MS dos iões $[M+CH_3COO]^-$ dos PC em com m/z 842,38 (18:1/18:2) (B) com as fragmentações padrão dos LPC.

Através da análise dos espectros de MS e MS/MS foram identificadas 14 espécies de PC e 5 espécies de LPC (Tabela 9). O PC mais abundante correspondia a um m/z 784,58 que corresponde ao PC (18:1/18:2). O LPC mais abundante corresponde ao m/z 538,39 que corresponde ao LPC (19:0). Curiosamente no perfil de AG não foi detectado o 19:0, porém sendo esta a única classe em que foi detectado indica a sua baixa abundância e, portanto, estaria abaixo do limite de detecção do aparelho.

Tabela 9 Identificação dos íons $[M+H]^+$ de PC e LPC observados no espectro de HPLC-MS. Os números entre parênteses (C: N) indicam o número de átomos de carbono (C) e de duplas ligações (N) nas cadeias de ácidos gordos substituintes; * não formou íon $[M+CH_3COO]^-$ e, portanto, não se determinou a composição em AG **não se obteve espectro MS/MS

$[M-H]^+ m/z$	Classe de lípidos (C: N)	Cadeias de ácidos gordos
756,6	PC (34:3)	*
778,5	PC (36:6)	*
780,6	PC (36:5)	16:0/20:5
782,6	PC (36:4)	18:2/18:2 e 16:0/20:4
784,6	PC (36:3)	18:1/18:2
786,6	PC (36:2)	18:1/18:1
796,5	PC	**
800,6	PC	**
804,6	PC (38:7)	*
806,6	PC (38:6)	18:2/20:5 e 20:5/18:1
826,5	PC	**
828,6	PC (40:9)	*
830,6	PC	**
496,3	LPC (16:0)	
522,4	LPC (18:1)	
542,3	LPC (20:5)	
544,3	LPC (20:4)	

Fosfatidiletanolaminas (PE)

As PE foram identificadas no modo positivo e negativo como iões $[M+H]^+$ e $[M-H]^-$. A análise dos espectros MS/MS permitiu a identificação da composição em AG da espécie molecular. Os espectros de MS/MS dos iões $[M+H]^+$ das PE apresentam uma perda característica de 141 Da permitindo a confirmação da classe de lípidos. Porém apenas nos espectros $[M-H]^-$ é possível determinar a composição em AG através da formação de aniões carboxilato. Na figura 38 é possível verificar a perda de 141 Da no espectro $[M+H]^+$ e a presença dos aniões carboxilato com m/z 253 e 279 correspondentes aos AG 16:1 e 18:2, respectivamente.

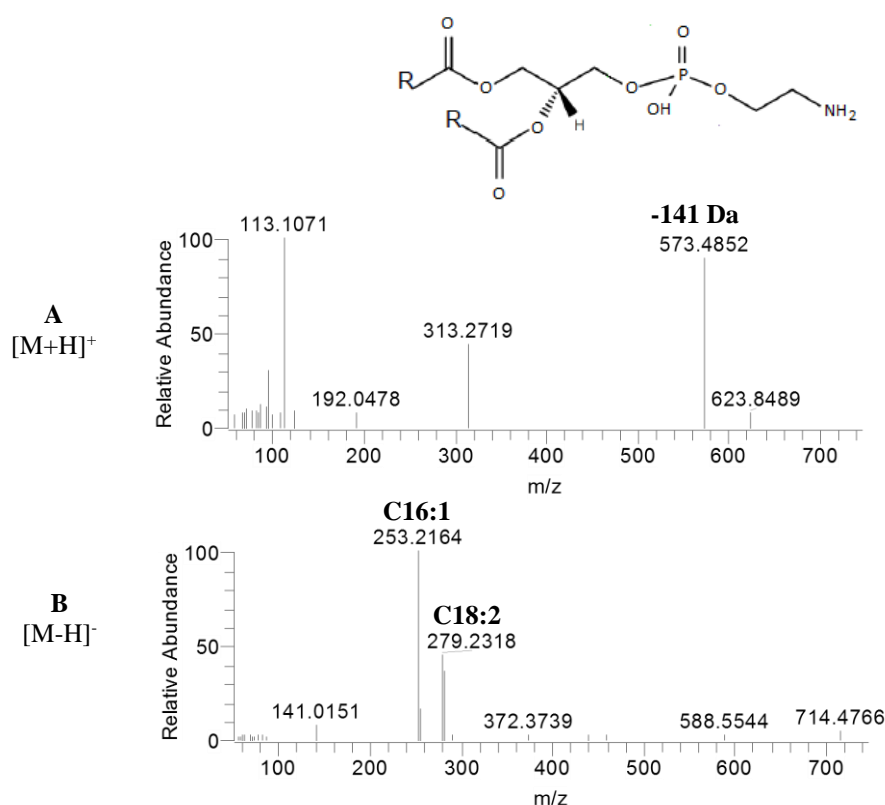


Figura 38 Estrutura geral dos PE (acima), espectro MS/MS do PE em $[M+H]^+$ com m/z 714.45 (A) e espectro MS/MS do PE em $[M-H]^-$ com m/z 714.48 (16:1/18:1 e 16:0/18:2) com as fragmentações padrão dos PE.

Através da análise MS/MS foi identificada uma espécie de PE. A espécie molecular detetada apresentava m/z 738.5 correspondendo à PE (36:5) contudo não foi possível adquirir o espectro MS/MS desta espécie (tabela 10).

Tabela 10 Identificação dos iões $[M+H]^+$ de PE observados no espectro de HPLC-MS. Os números entre parênteses (C: N) indicam o número de átomos de carbono (C) e de duplas ligações (N) nas cadeias de ácidos gordos substituintes.

$[M+H]^+ m/z$	Classe de lípidos (C: N)	Cadeias de ácidos gordos
714,5	PE (34:2)	16:1/18:1 e 16:0/18:2
738,5	PE (36:5)	*

Ácido fosfatídico (PA)

Os PA foram analisados por HPLC-MS em modo negativo através da formação de iões $[M-H]^-$. Os espectros MS/MS dos iões $[M-H]^-$ de PA mostram iões fragmento correspondentes aos AG com formação dos aniões carboxilato ($RCOO^-$) e o pico com m/z 153 correspondente ao glicerol fosfato menos água. (Figura 39).

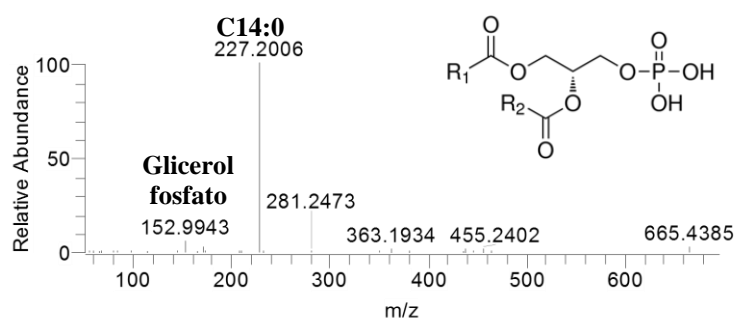


Figura 39 Estrutura geral dos PA (acima) e espectro MS/MS do PA em $[M-H]^-$ com m/z 665.44 (14:0/20:5).

Através da análise MS/MS foram identificadas 5 espécies de PA (tabela 11) sendo o mais abundante o PA com m/z 665.44 correspondendo ao 14:0/ 20:5.

Tabela 11 Identificação dos iões $[M-H]^-$ de PA observados no espectro de HPLC-MS. Os números entre parênteses (C: N) indicam o número de átomos de carbono (C) e de duplas ligações (N) nas cadeias de ácidos gordos substituintes.

$[M+H]^+ m/z$	Classe de lípidos (C: N)	Cadeias de ácidos gordos
591,4	PA (28:0)	(14:0/14:0)
665,4	PA (34:5)	(14:0/20:5)
693,4	PA (36:5)	(16:0/20:5)
741,4	PA (40:9)	(20:4/20:5)
743,5	PA (40:8)	(20:4/20:4)

Inositolfosfoceramidas (IPC)

As IPC têm um inositol ligado a uma fosfoceramida. São considerados biomarcadores importantes das Rhodophyta de acordo com as abordagens lipidômicas reportadas para a *Gracilaria* e *Chondrus crispus* (90,91). As IPC foram identificadas no modo negativo com a formação de íons $[M-H]^-$. Os espectros MS/MS desta classe mostram fragmentações típicas como a perda de 162 Da e 180 Da correspondente à perda de inositol. Para além disso pode observar-se o íão a m/z 241 que corresponde ao anião cíclico inositol-1,2-fosfato e com m/z 259 correspondente ao anião inositol monofosfato (Figura 41). Foi detetado apenas uma espécie de IPC com m/z de 920 correspondendo à IPC (t42:2-OH) (tabela 12).

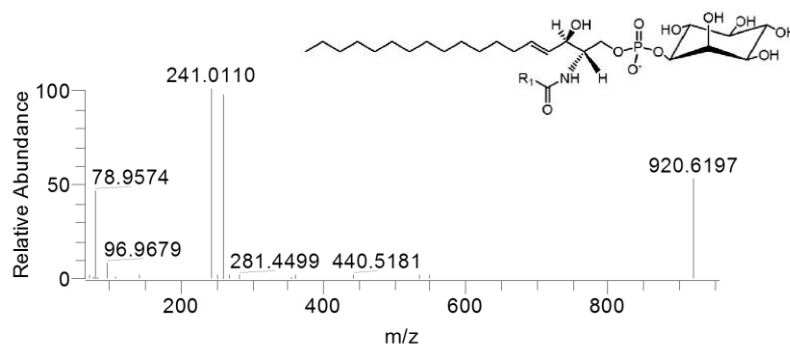


Figura 40 Estrutura geral dos IPC (acima) e espectro MS/MS do IPC em $[M-H]^-$ com m/z 920.62 com as fragmentações padrão dos IPC.

Tabela 12 Identificação dos íons $[M-H]^-$ de IPC observados no espectro de HPLC-MS. Os números entre parênteses (C: N) indicam o número de átomos de carbono (C) e de duplas ligações (N) nas cadeias de ácidos gordos substituintes.

$[M-H]^-$ m/z	Classe de lípidos (C: N)
920.6	IPC (t42:2-OH)

2.3.3. Perfil de Betaínas na *G. turuturu*

As betaínas são uma classe de acilglicerolípidos que apresentam um álcool de uma amina quaternária ligada por uma ligação éter a um diacilglicerol ou monoacilglicerol (DGTS e MGTS, respetivamente). Esta classe de lípidos está presente amplamente em algas.

Diacilgliceriltrimetilhomoserina (DGTS) e monoacilgliceriltrimetilhomoserina (MGTS)

Os espectros LC-MS dos DGTS e MGTS foram obtidos no modo positivo através da formação de íons $[M+H]^+$. Apesar de incomum as MGTS já tinham sido identificadas na macroalga *Codium tomentosum* e *Gracilaria* (90,92). Os espectros MS/MS dos íons $[M+H]^+$ tanto das DGTS como MGTS mostram um íon produto com m/z 236 resultante da perda de ambos os AG, permitindo confirmar esta classe de lípidos. Os íons formados devido às perdas características de 87 Da (perda de $CH_2CH_2N^+(CH_3)_3$), 74 Da (perda de $CH_2N^+(CH_3)_3$) e 59 Da (perda de $N^+(CH_3)_3$) estão também presentes no espectro MS/MS (Figura 41).

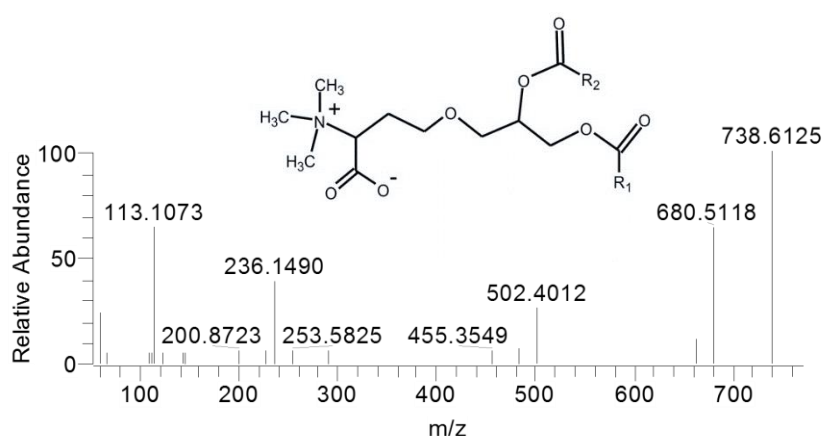


Figura 41 Estrutura geral dos DGTS (acima) e espectro MS/MS do DGTS em $[M+H]^+$ com m/z 738.61 com as fragmentações padrão.

Foram identificadas 3 espécies de DGTS e 1 espécie de MGTS na *G. turuturu* após 7 semanas de cultivo em IMTA (Tabela 13). O íon $[M+H]^+$ de DGTS mais abundante apresenta um m/z de 736,0 correspondente à DGTS 16:1/18:1. Na classe das MGTS apenas a espécie molecular com m/z 472,36 foi identificada que corresponde à MGTS (16:1).

Tabela 13 Identificação dos íons $[M+H]^+$ de DGTS e MGTS observados no espectro de HPLC-MS. Os números entre parênteses (C: N) indicam o número de átomos de carbono (C) e de duplas ligações (N) nas cadeias de ácidos gordos substituintes

$[M+H]^+ m/z$	Classe de lípidos (C: N)	Cadeias de ácidos gordos
736,6	DGTS (34:2)	16:1/18:1
738,6	DGTS (34:1)	16:0/18:1
764,6	DGTS (36:2)	18:1/18:1
472,4	MGTS (16:1)	16:1

De um modo geral, no grupo dos GL foram identificadas MGDG (2 espécies), DGDG (4 espécies), SQDG (11 espécies) e SQMG (1 espécie). As espécies mais abundantes de GL eram as que continham 16:0/20:5. O que está de acordo com o perfil de AG uma vez que estes eram os mais abundantes. Foi detetado a ocorrência de PUFA hidroxilado, nomeadamente EPA. AG oxidados, incluindo AG hidroxilados são metabolitos que ocorrem naturalmente nas plantas e outros organismos (90). Nos organismos marinhos estes podem ser produzidos enzimaticamente através da lipoxigenase. Estes AG estão envolvidos nos mecanismos de defesa e são considerados componentes essenciais de mecanismos imunitários inatos. Foi também identificada um SQMG que já tinham sido identificado para a macroalga *Codium tomentosum* (90). O SQMG 16:0 também já tinha sido encontrada em espinafres e reportado como tendo atividade antitumoral. Os glicolípidos estão predominantemente localizados nas membranas fotossintéticas, membranas dos tilacoides e membrana extraplastidiais, o seu papel é fornecer energia e servir como marcadores de reconhecimento celular. Verificou-se que os GL têm uma grande quantidade de PUFA *n*-3 sendo, portanto, produtos com valor nutricional que podem ser usados em alimentos funcionais, cosmética e farmacêutica. Foram descritas propriedades bioativas para as SQDG, MGDG e DGDG de entre as quais as propriedades anti-inflamatórias e antivirais.

Quanto aos PL da *G. turuturu* foram identificadas 14 espécies de PC, 1 espécie de LPC, 6 espécies de PG, 2 espécies de LPG, 5 espécies de PA e uma espécie de PE e outra de IPC. As espécies mais abundantes foram as que continham 20:5/16:0 e 18:1. Os PL presentes nas algas foram descritos como importantes para a função cognitiva para além de lutarem contra doenças inflamatórias, apresentarem atividade antiviral, antibacteriana e antitumoral.

Nas betaínas, foram identificadas 4 espécies de DGTS e uma de MGTS. Esta classe de lípidos só foi detetada em duas algas vermelhas *Gracilaria* e *chondrus* (90) através de abordagem de espetrometria de massa uma vez que os estudos efetuados anteriormente usam técnicas menos sensíveis como o TLC. Apenas foi detetado um esfingolípidos (IPC) apesar desta classe estar descrita como biomarcador em algas vermelhas (59).

Capítulo V

Atividade antioxidante da *G. turuturu*

As algas são conhecidas como fontes de diversos compostos bioativos. Várias atividades bioativas têm sido reportadas, como a atividade antioxidante, antibacteriana, anti-inflamatória, antiviral, anti proliferativa, etc (67,69,79). Neste trabalho foi estudada a atividade antioxidante do extrato lipídico da *G. turuturu*. Vários estudos reportam a ocorrência de atividade antioxidante em algas vermelhas (93,94). Contudo, existem poucos estudos que reportam a atividade antioxidante da *G. turuturu* sendo que nenhum deles reporta a atividade antioxidante do extrato lipídico desta alga. A atividade antioxidante refere-se à capacidade de um determinado composto doar elétrons atenuando os efeitos negativos das espécies reativas de oxigênio (ROS) e radicais livres. As ROS e os radicais livres são produzidos constantemente pelo corpo humano como subprodutos de vários processos bioquímicos, fisiológicos e metabólicos que ocorrem durante o normal funcionamento do corpo humano (95). Os efeitos adversos dos ROS e radicais livres são controlados pelos mecanismos antioxidantes do próprio corpo. Contudo, a produção de ROS em excesso causa dano oxidativo no DNA, em lípidos e proteínas levando a doenças crônicas como o cancro, diabetes, envelhecimento, arteriosclerose, inflamação e outras doenças degenerativas (95,96). O aumento do consumo de antioxidantes na dieta pode ajudar a manter o balanço entre oxidantes e antioxidantes no corpo. Vários antioxidantes naturais foram identificados como potenciais neutralizadores do efeito adverso de radicais livres (97). Vários tipos de compostos sintéticos foram testados no processamento alimentar de modo a colmatar os efeitos adversos dos ROS. No entanto, o uso excessivo de compostos sintéticos leva a um potencial risco para a saúde, risco de cancro e rejeição por parte do consumidor (98). O uso de antioxidantes sintéticos em alimentos pode ser substituído por antioxidantes naturais presentes, por exemplo nas algas. Neste sentido foi testada a atividade antioxidante do extrato lipídico da *G. turuturu* através do método do radical 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH). Neste método o cromogéneo roxo (DPPH[•]) é reduzido por compostos antioxidantes/redutores à correspondente hidrazina (amarelo) e quantificado por espectrofotometria.

I. Materiais e Métodos

1.1. Método de DPPH

Para determinar a atividade antioxidante do extrato lipídico da *G. turuturu* usou-se o método de DPPH em microplaca. Foi seguido o método descrito por Silva *et al.* (99). Para isso, foi preparada uma solução *stock* de DPPH em etanol (250 µmol/L) e mantida no escuro à temperatura ambiente. No dia da análise, foram preparadas diferentes concentrações de DPPH[•] (entre 10 e 300 µmol/L) em etanol. De seguida, a cada poço foram adicionados 150 µL de cada diluição de DPPH[•] e 150 µL de etanol e mediu-se a absorvância a 517 nm à temperatura ambiente após 2 min de incubação usando

um espectrofotômetro UV-visível (Multiskan GO 1.00.38, Thermo Scientific, Hudson, NH, USA) controlado pelo software SkanIT versão 3.2 (Thermo Scientific™). Foi traçada uma curva de calibração de DPPH· de modo a determinar a diluição necessária da solução *stock* de DPPH· para a qual o valor de absorvância fosse 0.9. Esta solução foi utilizada para as análises posteriores. Para a avaliação da capacidade sequestrante do radical DPPH foi colocado em cada poço 150 µl de cada solução padrão de Trolox (entre 5 a 75 µmol/L em etanol), os extratos de lípidos totais de *G. turuturu* (300 e 150 µg/mL em etanol) e posteriormente 150 µL de DPPH· em etanol. A atividade sequestrante do DPPH· nos padrões e nas amostras foi monitorada a 517 nm após o início da reação a cada 5 min durante 120 min à temperatura ambiente. A microplaca foi agitada automaticamente nos 5 segundos antes de cada leitura. Para cada amostra a experiência foi efetuada em triplicado. De modo a avaliar a estabilidade do radical durante o tempo de reação, foi medida a absorvância do DPPH· na ausência de espécies antioxidantes (branco) a 517 nm a cada 5 min após o início de reação à temperatura ambiente de modo que após 120 min a diminuição fosse inferior a 5%. A percentagem de DPPH· foi calculada usando a seguinte equação:

$$\% DPPH \cdot = \frac{Abs \text{ após tempo de incubação}}{Abs \text{ no inici da reação}} \times 100$$

A atividade antioxidante das amostras testadas expressa como percentagem de inibição do radical DPPH· foi calculada (aos 60 e 120 min) usando a seguinte equação:

$$\% \text{ inibição} = \frac{Abs DPPH \cdot - Abs \text{ amostra}}{Abs DPPH \cdot} \times 100$$

Os valores IC₅₀ (concentração de amostra que induzem a redução de DPPH· para 50%) após 60 min de reação foram calculados por regressão linear a partir da curva de calibração. Os resultados foram também expressos em equivalentes de Trolox (ET, µmol de Trolox/ g de amostra) através da equação:

$$ET = \frac{IC50 \text{ Trolox } (\mu\text{mol/L})}{IC50 \text{ amostra } (\mu\text{g/mL})} \times 1000$$

II. Resultados e Discussão

De modo a avaliar a capacidade antioxidante da *G. turuturu* selvagem e em IMTA em períodos homólogos (recolhida em fevereiro e após 7 semanas em cultivo), foi avaliada a capacidade sequestrante do radical DPPH·. Os resultados obtidos estão descritos na tabela 14. Através da análise dos resultados verificamos que a *G. turuturu* apresenta alguma atividade antioxidante apesar de não existirem diferenças significativas entre a atividade antioxidante de *G. turuturu* de cultivo e selvagem.

Tabela 14 Resultados do ensaio de DPPH para a determinação da atividade antioxidante

	Concentrações (µg/mL)	IC ₅₀ (mg/ml)	ET (µmol/g)
Cultivo 7 semanas	300 e 500	1.490	19.75
Selvagem final	300 e 500	1.495	19.70

Num estudo feito por Zubia *et al.* (94) acerca da atividade antioxidante de várias espécies de algas vermelhas verifica-se os valores de IC₅₀ mostrados na tabela acima são inferiores aos obtidos para o extrato lipídico da espécie *Grateloupia filicina* (IC₅₀, 16.40 mg/ml). Valores inferiores de IC₅₀ indicam uma maior atividade antioxidante uma vez que a concentração necessária para remover 50% do DPPH é menor. Para além disso, os valores obtidos para a *G. turuturu* são comparáveis aos do extrato lipídico da espécie *Furcellaria fastigiata*, a segunda alga com maior atividade antioxidante desse estudo (94). O estudo de Jiang *et al.* mostra a variação da atividade antioxidante de extratos de éter de petróleo, acetato de etilo, butanol e aquoso da espécie *Grateloupia livida*. Nesse estudo verificou-se que para o teste do DPPH o extrato mais apolar (éter de petróleo) apresenta um menor IC₅₀ e, portanto, uma maior atividade antioxidante.

O único estudo que testa a atividade antioxidante da *G. turuturu* testa apenas a atividade antioxidante enzimática (78). O estudo de Liu *et al.* revela que a *G. turuturu* apresenta maior atividade das enzimas superóxido dismutase, peróxido dismutase e catalase do que a *Palmaria palmata* revelando uma maior capacidade de sequestrar espécies reativas de oxigénio e de tolerar o stress oxidativo. Desta forma, baseado nos nossos resultados verifica-se que o extrato lipídico da *G. turuturu* apresenta uma atividade antioxidante elevada quando comparada com outras espécies de algas vermelhas.

Capítulo VI

Conclusão

I. Considerações finais

A *G. turuturu* é uma alga não nativa que tem crescido na costa Portuguesa, indicando um fácil crescimento nas condições climáticas do nosso país. Assim, dado à sua grande capacidade de crescimento, houve o interesse de testar a viabilidade da produção desta alga em aquacultura avaliando a sua composição de modo a explorar a suas potencialidades como fonte de compostos bioativos. O cultivo desta alga em aquacultura permite o aumento de biomassa através de condições controladas e a produção de algas pode ser adaptada conforme a aplicação final. Neste trabalho foi feito um cultivo experimental de *G. turuturu* num sistema IMTA, avaliando de forma preliminar a influência da fase do ciclo de vida (reprodutiva e não reprodutiva) no seu crescimento. Foi estudada a composição bioquímica da alga, nomeadamente o perfil de ácidos gordos e lípidos polares utilizando uma abordagem lipidómica, comparando os valores obtidos para a alga de aquacultura com a alga selvagem. Para além disso, foi testada a capacidade antioxidante do extrato lipídico da *G. turuturu* selvagem e de cultivo.

De um modo geral, foi possível produzir *G. turuturu* no sistema IMTA durante o período da experiência que coincidiu com a fase lenta de crescimento da alga reportada por Araújo *et al.* (8). Em aquacultura observou-se um crescimento significativo de biomassa enquanto que em ambiente selvagem o crescimento da alga foi menor mostrando-se difícil, devido à escassez, de recolher indivíduos selvagens no período final da experiência. Durante o cultivo as algas em fase reprodutiva apresentaram um maior crescimento e produtividade que as algas em fase não reprodutiva. Verificou-se que a maior taxa de crescimento e produtividade se registou à segunda semana em ambas as fases do ciclo de vida coincidindo com a altura de maior temperatura e luminosidade.

Em termos de composição bioquímica verificou-se que a alga em fase reprodutiva à 7ª semana de cultivo apresentava um maior teor em proteína, lípido e fibra, mas um teor menor em cinza quando comparando com o início do cultivo e com a alga selvagem final. Já a alga em fase não reprodutiva à 7ª semana de cultivo apresentava um maior teor de proteína e fibra, mas um menor teor de lípidos e cinza quando comparado com o início de cultivo e com a selvagem final. Em termos de composição lipídica observa-se que os AG detetados são os mesmos para a alga de cultivo e ambiente selvagem e entre as fases do ciclo de vida. Contudo os AG estão presentes em quantidades diferentes sendo os AG mais abundantes o 16:0, 20:4 e 20:5. Quanto ao tipo de AG presente observou-se que a *G. turuturu* em fase não reprodutiva às 7 semanas de cultivo apresentava menor quantidade de PUFA e mais SFA, apesar de a quantidade de PUFA estar diminuída o rácio $n-6/n-3$ foi de 0,52, um valor bastante baixo quando comparado com outros alimentos (100,101). A alga em fase reprodutiva às 7 semanas de cultivo apresentava um maior teor de PUFA e menor teor de SFA quando comparado

com o início do cultivo, contudo o rácio $n-6/n-3$ de 0,57 foi inferior ao obtido para a alga não reprodutiva à 7ª semana de cultivo, mas ainda assim bastante baixo. Este estudo permitiu ainda identificar a composição detalhada dos lípidos polares presentes na *G. turuturu* cultivada em IMTA incluindo GL, PL e betaínas. Em termo de lípidos polares verificou-se que a *G. turuturu* apresentava GL das classes SQDG, SQMG, DGDG e MGDG, foram também identificadas espécies de betaínas (DGTS e MGTS) e fosfolípidos das classes PG, LPG, PC, LPC, PE e PA e ainda um esfingolípido, a IPC. Em todas as classes de lípidos havia uma grande abundância de PUFA nos AG substituintes, corroborando com os resultados obtidos por GC-MS.

A avaliação da atividade antioxidante do extrato lipídico de *G. turuturu* mostrou a presença desta bioatividade. A atividade antioxidante da *G. turuturu* selvagem e de cultivo é semelhante. Os valores de EC_{50} obtidos para a atividade antioxidante do extrato lipídico da *G. turuturu* são comparáveis aos obtidos no estudo de Zubia *et al.*(94) onde foi determinada a atividade antioxidante do extratos lipídicos de várias algas vermelhas selvagens. Neste sentido, a *G. turuturu* era uma das algas vermelhas com maior atividade antioxidante.

Através da análise dos dados acima citados conclui-se que o cultivo da *G. turuturu* foi um sucesso em ambas as fases do ciclo de vida uma vez que permitiu aumentar o teor em proteínas e fibra e baixar o teor de cinzas conjuntamente com o rácio $n-6/n-3$. Com um rácio $n-6/n-3$ baixo verifica-se que o consumo desta alga pode estar relacionado com a prevenção de doenças cardiovasculares (42). Desta forma, observa-se que a *G. turuturu* atende à crescente demanda comercial por produtos naturais e saudáveis com alto valor nutricional, e desta forma apresenta diversas aplicabilidades dentro da indústria alimentar, farmacêutica e cosmética. A produção desta alga em sistema de IMTA pode oferecer uma alternativa à recolha de biomassa em populações selvagens permitindo a produção de elevadas quantidades de biomassa durante todo o ano e com composição bioquímica conhecida, variável consoante as diferentes aplicações.

Futuramente, será necessário fazer um estudo mais extensivo da adaptação da *G. turuturu* ao cultivo durante todo o ano avaliando os parâmetros de cultivo e o interesse comercial entre as duas fases do ciclo de vida.

Bibliografia

1. Spolaore P, Joannis-Cassan C, Duran E, Isambert A. Commercial applications of microalgae. *J Biosci Bioeng*. 2006 Feb;101(2):87–96.
2. Valderrama D, Cai J, Hishamunda N, Ridler NB, Food and Agriculture Organization of the United Nations, editors. Social and economic dimensions of carrageenan seaweed farming. Rome: Food & Agriculture Organization of the United Nations; 2013. 204 p. (FAO fisheries and aquaculture technical paper).
3. de Séligny JFP, Grainger R. The State of World Fisheries and Aquaculture 2010. Food and Agriculture Organization of the United Nations; 2010.
4. Reis RP, Castelar B, Santos AA dos. Why is algaculture still incipient in Brazil? *J Appl Phycol* [Internet]. 2016 Jul 1 [cited 2016 Nov 28]; Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s10811-016-0890-8>
5. Troell M, Joyce A, Chopin T, Neori A, Buschmann AH, Fang J-G. Ecological engineering in aquaculture — Potential for integrated multi-trophic aquaculture (IMTA) in marine offshore systems. *Aquaculture*. 2009 Dec;297(1–4):1–9.
6. Chopin T, Buschmann AH, Halling C, Troell M, Kautsky N, Neori A, Kraemer GP, Zertuche-González JÁ, Yarish C, Neefus C. Integrating seaweeds into marine aquaculture systems: a key toward sustainability. *J Phycol*. 2001;37(6):975–986.
7. Barrington K, Chopin T, Robinson S, others. Integrated multi-trophic aquaculture (IMTA) in marine temperate waters. *Integr Maric Glob Rev FAO Fish Aquac Tech Pap*. 2009;529:7–46.
8. Araújo R, Violante J, Pereira R, Abreu H, Arenas F, Sousa-Pinto I. Distribution and population dynamics of the introduced seaweed *Grateloupia turuturu* (Halymeniaceae, Rhodophyta) along the Portuguese coast. *Phycologia*. 2011 Jul 13;50(4):392–402.
9. Mathieson AC, Dawes CJ, Pederson J, Gladych RA, Carlton JT. The Asian red seaweed *Grateloupia turuturu* (Rhodophyta) invades the Gulf of Maine. *Biol Invasions*. 2008 Oct;10(7):985–8.
10. Simon C, Gall EA, Deslandes E. Expansion of the red alga *Grateloupia doryphora* along the coasts of Brittany (France). *Hydrobiologia*. 2001;443(1–3):23–29.
11. Pereira L. Guia Ilustrado das Macroalgas. Imprensa da Universidade de Coimbra / Coimbra University Press; 2009. 94 p.
12. Denis C, Le Jeune H, Gaudin P, Fleurence J. An evaluation of methods for quantifying the enzymatic degradation of red seaweed *Grateloupia turuturu*. *J Appl Phycol*. 2009;21(1):153–9.
13. Wang Y, Ames NP, Tun HM, Tosh SM, Jones PJ, Khafipour E. High Molecular Weight Barley β -Glucan Alters Gut Microbiota Toward Reduced Cardiovascular Disease Risk. *Front Microbiol*. 2016;7.
14. Ito K, Hori K. Seaweed: Chemical composition and potential food uses. *Food Rev Int*. 1989;5(1):101–44.
15. Munier M, Dumay J, Moránçais M, Jaouen P, Fleurence J. Variation in the Biochemical Composition of the Edible Seaweed *Grateloupia turuturu* Yamada Harvested from Two Sampling Sites on the Brittany Coast (France): The Influence of Storage Method on the Extraction of the Seaweed Pigment R-Phycoerythrin. *J Chem*. 2013;1–8.
16. Perfeto PNM. Relation between chemical composition of *Grateloupia doryphora* (Montagne) Howe, *Gymnogongrus griffithsiae* (Turner) Martius, and abiotic parameters. *Acta Bot Bras*. 1998;12(1):77–88.
17. Hotimchenko SV. Fatty acid composition of algae from habitats with varying amounts of illumination. *Russ J Mar Biol*. 2002;28(3):218–220.
18. Nelson MM, Phleger CF, Nichols PD. Lipid Composition in Macroalgae of the Northeastern Pacific Ocean. *Bot Mar*. 2002;45:58–65.

19. Denis C, Moránçais M, Li M, Deniaud E, Gaudin P, Wielgosz-Collin G, Barnathan G, Jaouen P, Fleurence J. Study of the chemical composition of edible red macroalgae *Grateloupia turuturu* from Brittany (France). *Food Chem.* 2010 1;119(3):913–7.
20. Rodrigues D, Freitas AC, Pereira L, Rocha-Santos TAP, Vasconcelos MW, Roriz M, Rodríguez-Alcalá LM, Gomes AMP, Duarte AC. Chemical composition of red, brown and green macroalgae from Buarcos bay in Central West Coast of Portugal. *Food Chem.* 2015 Sep;183:197–207.
21. Fujiwara-Arasaki T, Mino N, Kuroda M. The protein value in human nutrition of edible marine algae in Japan. In: Bird CJ, Ragan MA, editors. *Eleventh International Seaweed Symposium*. Springer Netherlands; 1984. p. 513–6. (Developments in Hydrobiology).
22. Kendel M, Couzinet-Mossion A, Viau M, Fleurence J, Barnathan G, Wielgosz-Collin G. Seasonal composition of lipids, fatty acids, and sterols in the edible red alga *Grateloupia turuturu*. *J Appl Phycol.* 2013 Apr;25(2):425–32.
23. Jiménez-Escrig BS, Sánchez-Muniz. Dietary fibre from edible seaweeds: chemical structure, physicochemical properties and effects on cholesterol metabolism. *Nutr Res.* 2000;20(4):585–98.
24. García-Bueno N, Decottignies P, Turpin V, Dumay J, Paillard C, Stiger-Pouvreau V, Kervarec N, Pouchus YF, Marín-Atucha AA, Fleurence J. Seasonal antibacterial activity of two red seaweeds, *Palmaria palmata* and *Grateloupia turuturu*, on European abalone pathogen *Vibrio harveyi*. *Aquat Living Resour.* 2014;27(2):83–9.
25. Kim S-K, editor. *Marine medicinal foods: implications and applications, macro and microalgae*. 1. ed. Amsterdam: Elsevier, Acad. Press; 2011. 466 p. (Advances in food and nutrition research).
26. Fleurence J. Seaweed proteins: biochemical, nutritional aspects and potential uses. *Trends Food Sci Technol.* 1999;10(1):25–28.
27. Galland-Irmouli AV, Pons L, Luçon M, Villaume C, Mrabet NT, Guéant JL, Fleurence J. One-step purification of R-phycoerythrin from the red macroalga *Palmaria palmata* using preparative polyacrylamide gel electrophoresis. *J Chromatogr B Biomed Sci App.* 2000 28;739(1):117–23.
28. Gantt E. Phycobilisomes. *Annu Rev Plant Physiol.* 1981;32(1):327–347.
29. O'Carra P, Murphy RF, Killilea SD. The native forms of the phycobillin chromophores of algal biliproteins. A clarification. *Biochem J.* 1980 May 1;187(2):303–9.
30. Glazer AN. Phycobilisome a macromolecular complex optimized for light energy transfer. *Biochim Biophys Acta BBA-Rev Bioenerg.* 1984;768(1):29–51.
31. Glazer AN, Hixson CS. Characterization of R-phycoerythrin. Chromophore content of R-phycoerythrin and C-phycoerythrin. *J Biol Chem.* 1975;250(14):5487–5495.
32. Ficner R, Huber R. Refined crystal structure of phycoerythrin from *Porphyridium cruentum* at 0.23-nm resolution and localization of the γ subunit. *Eur J Biochem.* 1993 Nov 1;218(1):103–6.
33. Denis C, Moránçais M, Gaudin P, Fleurence J. Effect of enzymatic digestion on thallus degradation and extraction of hydrosoluble compounds from *Grateloupia turuturu*. *Bot Mar.* 2009;52(3).
34. Galland-Irmouli A-V, Fleurence J, Lamghari R, Luçon M, Rouxel C, Barbaroux O, Bronowicki JP, Villaume C, Guéant JL. Nutritional value of proteins from edible seaweed *Palmaria palmata* (Dulse). *J Nutr Biochem.* 1999;10(6):353–359.
35. Usov AI. Sulfated polysaccharides of the red seaweeds. *Food Hydrocoll.* 1992;6(1):9–23.
36. Maciel E, Leal MC, Lillebø AI, Domingues P, Domingues MR, Calado R. Bioprospecting of Marine Macrophytes Using MS-Based Lipidomics as a New Approach. *Mar Drugs.* 2016 8;14(3):49.
37. Watson AD. Thematic review series: Systems Biology Approaches to Metabolic and Cardiovascular Disorders. Lipidomics: a global approach to lipid analysis in biological systems. *J Lipid Res.* 2006 1;47(10):2101–11.
38. Lagarde M, Géløen A, Record M, Vance D, Spener F. Lipidomics is emerging. Elsevier; 2003.
39. Plouguerné E, da Gama BAP, Pereira RC, Barreto-Bergter E. Glycolipids from seaweeds and their potential biotechnological applications. *Front Cell Infect Microbiol.* 2014;4:174.

40. Kumari P, Kumar M, Gupta V, Reddy CRK, Jha B. Tropical marine macroalgae as potential sources of nutritionally important PUFAs. *Food Chem.* 2010;120(3):749–57.
41. Lopes G, Daletos G, Proksch P, Andrade PB, Valentão P. Anti-inflammatory potential of monogalactosyl diacylglycerols and a monoacylglycerol from the edible brown seaweed *Fucus spiralis linnaeus*. *Mar Drugs.* 2014;12(3):1406–18.
42. Simopoulos AP. The Importance of the Omega-6/Omega-3 Fatty Acid Ratio in Cardiovascular Disease and Other Chronic Diseases. *Exp Biol Med.* 2008 1;233(6):674–88.
43. Simopoulos AP. The importance of the ratio of omega-6/omega-3 essential fatty acids. *Biomed Pharmacother.* 2002;56(8):365–379.
44. Calder PC, Grimble RF. Polyunsaturated fatty acids, inflammation and immunity. *Eur J Clin Nutr.* 2002;56(S3):S14.
45. Kendel M, Barnathan G, Fleurence J, Rabesaotra V, Wielgosz-Collin G. Non-methylene Interrupted and Hydroxy Fatty Acids in Polar Lipids of the Alga *Grateloupia turuturu* Over the Four Seasons. *Lipids.* 2013;48(5):535–45.
46. Adlerstein D, Bigogno C, Khozin I, Cohen Z. The effect of growth temperature and culture density on the molecular species composition of the galactolipids in the red microalga *porphyhdium cruentum* (rhodophyta) 1. *J Phycol.* 1997;33(6):975–979.
47. Gs K. Squalene and its potential clinical uses. *Altern Med Rev J Clin Ther.* 1999 1999;4(1):29–36.
48. Di Mascio P, Murphy ME, Sies H. Antioxidant defense systems: the role of carotenoids, tocopherols, and thiols. *Am J Clin Nutr.* 1991;53(1):194S–200S.
49. Plouguerné E, Kikuchi H, Oshima Y, Deslandes E, Stiger-Pouvreau V. Isolation of Cholest-5-en-3-ol formate from the red alga *Grateloupia turuturu* Yamada and its chemotaxonomic significance. *Biochem Syst Ecol.* 2006;34(9):714–7.
50. Suzuki K, Shimizu T, Nakata T. The cholesterol metabolite cholest-4-en-3-one and its 3-oxo derivatives suppress body weight gain, body fat accumulation and serum lipid concentration in mice. *Bioorg Med Chem Lett.* 1998;8(16):2133–2138.
51. Khotimchenko SV. Distribution of glyceroglycolipids in marine algae and grasses. *Chem Nat Compd.* 2002;38(3):223–229.
52. Khotimchenko SV, Vas'kovsky VE. An Inositol-Containing Sphingolipid from the Red Alga *Gracilaria verrucosa*. *Russ J Bioorganic Chem.* 2004 1;30(2):168–71.
53. Kato M, Sakai M, Adachi K, Ikemoto H, Sano H. Distribution of betaine lipids in marine algae. *Phytochemistry.* 1996;42(5):1341–1345.
54. Cañavate JP, Armada I, Ríos JL, Hachero-Cruzado I. Exploring occurrence and molecular diversity of betaine lipids across taxonomy of marine microalgae. *Phytochemistry.* 2016;124:68–78.
55. Dembitsky VM. Betaine ether-linked glycerolipids: chemistry and biology. *Prog Lipid Res.* 1996;35(1):1–51.
56. Araki S, Eichenberger W, Sakurai T, Sato N. Distribution of diacylglycerylhydroxymethyltrimethyl- β -alanine (DGTA) and phosphatidylcholine in brown algae. *Plant Cell Physiol.* 1991;32(5):623–628.
57. Cox S, Abu-Ghannam N, Gupta S. An assessment of the antioxidant and antimicrobial activity of six species of edible Irish seaweeds. 2010
58. Araki S, Sakurai T, Oohusa T, Kayama M, Nisizawa K. Content of arachidonic and eicosapentaenoic acids in polar lipids from *Gracilaria* (Gracilariales, Rhodophyta). In: Lindstrom SC, Gabrielson PW, editors. Thirteenth International Seaweed Symposium. Springer Netherlands; 1990. p. 513–9. (Developments in Hydrobiology).
59. Trevor R, Pettitt A, Jones L, Harwood JL. Lipids of the marine red algae, *Chondrus crispus* and *Polysiphonia lanosa*. *Phytochemistry.* 1989;28(2):399–405.
60. Food Composition Databases Show Foods .
61. Colombo ML, Risè P, Giavarini F, De Angelis L, Galli C, Bolis CL. Marine Macroalgae as Sources of Polyunsaturated Fatty Acids. *Plant Foods Hum Nutr.* 2006 Jun;61(2):64–9.

62. Hellio C, Simon-Colin C, Clare A, Deslandes E. Isethionic Acid and Floridoside Isolated from the Red Alga, *Grateloupia turuturu*, Inhibit Settlement of *Balanus amphitrite* Cyprid Larvae. *Biofouling*. 2004;20(3):139–45.
63. Reed RH, collins JC, russell G. The effects of salinity upon galactosyl-glycerol content and concentration of the marine red alga *Porphyra purpurea* (Roth) C. Ag. *J Exp Bot*. 1980;31(6):1539–1554.
64. Miyazawa K, Ito K. Isolation of L-methionine-l-sulfoxide and N-methylmethionine sulfoxide from a red alga *Grateloupia turuturu*. *Bulletin*. 1974;
65. Simon-Colin C, Kervarec N, Pichon R, Bessi eres M-A, Deslandes E. Characterization of N-methyl-L-methionine sulfoxide and isethionic acid from the red alga *Grateloupia doryphora*. *Phycol Res*. 2002;50(2):125–128.
66. Plouguern  E, Hellio C, Deslandes E, V eron B, Stiger-Pouvreau V. Anti-microfouling activities in extracts of two invasive algae: *Grateloupia turuturu* and *Sargassum muticum*. *Bot Mar*. 2008 1 ;51(3).
67. Plouguern  E.  tude  cologique et chimique de deux algues introduites sur les c tes bretonnes, *Grateloupia turuturu* Yamada et *Sargassum muticum* (Yendo) Fensholt : nouvelles ressources biologiques de compos s   activit  antifouling . Brest; 2006
68. Bourgaud F, Gravot A, Milesi S, Gontier E. Production of plant secondary metabolites: a historical perspective. *Plant Sci*. 2001;161(5):839–51.
69. Pang SJ, Xiao T, Shan TF, Wang ZF, Gao SQ. Evidences of the intertidal red alga *Grateloupia turuturu* in turning *Vibrio parahaemolyticus* into non-culturable state in the presence of light. *Aquaculture*. 2006;260(1–4):369–74.
70. Hawkins WW, Leonard VG. The antithrombic activity of carrageenin in human blood. *Can J Biochem Physiol*. 1963;41(5):1325–1327.
71. Anderson W, Duncan JGC, Harthill JE. The anticoagulant activity of carrageenan. *J Pharm Pharmacol*. 1965;17(10):647–654.
72. Shanmungan M, Mody KH. Heparinoid-activesulphatedpolysaccharides.pdf. *Current science*. 2000;79(12).
73. Kindness G, Long WF, Williamson FB. Enhancement of antithrombin III activity by carrageenans. *Thromb Res*. 1979;15(1):49–60.
74. Sen AK, Das AK, Sarkar KK, Siddhanta AK, Takano R, Kamei K, Hara S. An agaroid-carrageenan hybrid type backbone structure for the antithrombotic sulfated polysaccharide from *Grateloupia indica* Boergensen (Halymeniales, Rhodophyta). *Bot Mar*. 2002;45(4):331–338.
75. Hudson JB, Kim JH, Lee MK, DeWreede RE, Hong YK. Antiviral compounds in extracts of Korean seaweeds: Evidence for multiple activities. *J Appl Phycol*. 1998;10(5):427–434.
76. Matsuhira B, Conte AF, Damonte EB, Kolender AA, Matulewicz MC, Mej  as EG, Pujol CA, Z  niga EA. Structural analysis and antiviral activity of a sulfated galactan from the red seaweed *Schizymenia binderi* (Gigartinales, Rhodophyta). *Carbohydr Res*. 2005 31;340(15):2392–402.
77. Neushul M. Antiviral carbohydrates from marine red algae. In: Lindstrom SC, Gabrielson PW, editors. Thirteenth International Seaweed Symposium [Internet]. Springer Netherlands; 1990. p. 99–104. (Developments in Hydrobiology).
78. Liu F, Pang SJ. Stress tolerance and antioxidant enzymatic activities in the metabolisms of the reactive oxygen species in two intertidal red algae *Grateloupia turuturu* and *Palmaria palmata*. *J Exp Mar Biol Ecol*. 2010;382(2):82–7.
79. Athukorala Y, Lee K-W, Song C, Ahn C-B, Shin T-S, Cha Y-J, Shahidi F, Jeon YJ. Potential Antioxidant Activity of Marine Red Alga *Grateloupia Filicina* Extracts. *J Food Lipids*. 2003 1;10(3):251–65.
80. Lobban CS, Harrison PJ. Seaweed ecology and physiology. Cambridge: Cambridge Univ. Press; 1994. 366 p.
81. Pickmere SE, Parsons MJ, Bailey RW. Composition of *Gigartina* carrageenan in relation to sporophyte and gametophyte stages of the life cycle. *Phytochemistry*. 1973;12(10):2441–2444.
82. Carrington E, Grace SP, Chopin T. Life history phases and the biomechanical properties of the red alga *Chondrus crispus* (Rhodophyta). *J Phycol*. 2001;37(5):699–704.

83. Schwinning S, Weiner J. Mechanisms determining the degree of size asymmetry in competition among plants. *Oecologia*. 1998;113(4):447–455.
84. Hanelt D, Wiencke C, Karsten U, Nultsch W. Photoinhibition and recovery after high light stress in different developmental and life-history stages of *Laminaria saccharina* (phaeophyta). *J Phycol*. 1997;33(3):387–395.
85. Helrick K. Official methods of analysis. AOAC; 1990.
86. Jones DB, others. Factors for converting percentages of nitrogen in foods and feeds into percentages of proteins. US Department of Agriculture Washington, DC; 1941.
87. Rupérez P. Mineral content of edible marine seaweeds. *Food Chem*. 2002;79(1):23–26.
88. Aued-Pimentel S, Lago JHG, Chaves MH, Kumagai EE. Evaluation of a methylation procedure to determine cyclopropanoids fatty acids from *Sterculia striata* St. Hil. Et Nauds seed oil. *J Chromatogr A*. 2004;1054(1–2):235–9.
89. Kainz M, Brett MT, Arts MT, editors. *Lipids in Aquatic Ecosystems*. New York, NY: Springer New York; 2009
90. da Costa E, Melo T, Moreira A, Bernardo C, Helguero L, Ferreira I, Cruz M, Rego A, Domingues P, Calado R, Abreu MH, Domingues MR. Valorization of Lipids from *Gracilaria* sp. through Lipidomics and Decoding of Antiproliferative and Anti-Inflammatory Activity. *Mar Drugs*. 2017 2;15(3):62.
91. Melo T, Alves E, Azevedo V, Martins AS, Neves B, Domingues P, Calado R, Abreu MH, Domingues MH. Lipidomics as a new approach for the bioprospecting of marine macroalgae — Unraveling the polar lipid and fatty acid composition of *Chondrus crispus*. *Algal Res*. 2015 Mar 1;8:181–91.
92. da Costa E, Melo T, Moreira AS, Alves E, Domingues P, Calado R, Abreu MH, Domingues MR. Decoding bioactive polar lipid profile of the macroalgae *Codium tomentosum* from a sustainable IMTA system using a lipidomic approach. *Algal Res*. 2015;12:388–397.
93. Yuan YV, Bone DE, Carrington MF. Antioxidant activity of dulse (*Palmaria palmata*) extract evaluated in vitro. *Food Chem*. 2005;91(3):485–94.
94. Zubia M, Fabre M-S, Kerjean V, Deslandes E. Antioxidant and cytotoxic activities of some red algae (Rhodophyta) from Brittany coasts (France). *Bot Mar*. 2009 J;52(3).
95. Cai Y, Luo Q, Sun M, Corke H. Antioxidant activity and phenolic compounds of 112 traditional Chinese medicinal plants associated with anticancer. *Life Sci*. 2004;74(17):2157–84.
96. Patra J, Das G, Baek K-H. Chemical Composition and Antioxidant and Antibacterial Activities of an Essential Oil Extracted from an Edible Seaweed, *Laminaria japonica* L. *Molecules*. 2015 2;20(7):12093–113.
97. Halliwell B, Gutteridge JMC. *Free Radicals in Biology and Medicine*. Oxford University Press; 2015. 961 p.
98. Velioglu YS, Mazza G, Gao L, Oomah BD. Antioxidant Activity and Total Phenolics in Selected Fruits, Vegetables, and Grain Products. *J Agric Food Chem*. 1998 1;46(10):4113–7.
99. Silva EMP, Melo T, Sousa BC, Resende DISP, Magalhaes LM, Segundo MA, Silva MAS, Domingues MR. Do cinnamylideneacetophenones have antioxidant properties and a protective effect toward the oxidation of phosphatidylcholines? *Eur J Med Chem*. 2016 ;121:331–7.
100. Kale, raw Nutrition Facts & Calories. Available from: <http://nutritiondata.self.com/facts/vegetables-and-vegetable-products/2461/2>
101. Cabbage, red, raw Nutrition Facts & Calorie. Available from: <http://nutritiondata.self.com/facts/vegetables-and-vegetable-products/2373/2>